



Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología

# Análisis de la cohesión entre cromátidas hermanas en cromosomas meióticos de ratón

Memoria presentada por  
**Dña. Rocío Gómez Lencero**  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
Madrid, 2010

Vº Bº Director de la Tesis Doctoral

Dr. José Ángel Suja Sánchez  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid





El presente trabajo ha sido desarrollado en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. De los resultados obtenidos de la investigación se han publicado dos artículos en revistas científicas: E. Llano, R. Gómez, y col. *Genes Dev.* 22(17): 2400-13 (2008) y R. Gómez y col. *EMBO Rep.* 8(2): 173-80 (2007).

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Universitario (FPU) a Dña. Rocío Gómez Lencero. Tras completar dos años como becaria FPU y dos años de contrato en prácticas como Personal Docente e Investigador en Formación (PDIF) en la Universidad Autónoma de Madrid, la última etapa del desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido financiada con un contrato de Profesor Ayudante del departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid. Además, esta Tesis Doctoral ha sido financiada también con la concesión del Premio para jóvenes licenciados de la Fundación Francisco Cobos que fue otorgado a Dña. Rocío Gómez Lencero en octubre de 2004.

Toda la investigación en el laboratorio ha sido subvencionada por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro de los proyectos “Regulación de las divisiones meióticas durante la espermatogénesis de mamíferos” (BFU2005-05668-C03-01) y “Análisis de los mecanismos reguladores de la asociación entre cromátidas hermanas durante la meiosis” (BFU2008-00300/BMC), y de los proyectos cofinanciados para Creación o Consolidación de Grupos de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid “Cohesión entre cromátidas hermanas en la meiosis de mamíferos” e “Implicación de la DNA Topoisomerasa II  $\alpha$  en la meiosis de ratón” (CCG06-/UAM/SAL-0260).



*A mi familia,  
mi gran familia,  
a todos y cada uno de ellos.*

*“El hombre encuentra a Dios detrás  
de cada puerta que la ciencia logra  
abrir.” Albert Einstein (1879-1955)*

*“Un poco de ciencia aleja de Dios,  
pero mucha ciencia devuelve a Él.”  
Louis Pasteur (1822-1895)*



---

## ***Agradecimientos***





## Agradecimientos

Muchos dirán que escribir una Tesis y tener una familia son cosas incompatibles, pero gracias a la ayuda de muchas personas en mi caso sí ha sido posible. Por ello, quiero mostrar mi más sincero agradecimiento en unas líneas que jamás podrán resumir todas las gratificantes experiencias que he vivido en los últimos años.

*En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis, el Dr. José Ángel Suja Sánchez no sólo el haberme enseñado todo lo presentado en esta memoria, sino algo más importante, el enseñarme a mirar y no sólo a ver, y a tener siempre la ilusión por conocer algo nuevo. Te agradezco enormemente que me hayas corregido esta memoria tan minuciosamente, pues con ello he aprendido muchísimo. Y como no, gracias también Jose por comprender mi situación personal, pues has sido siempre un jefe ejemplar. Gracias también al Dr. Julio Sánchez Rufas, por deleitarme con su arte al hacer cualquier cosa que se proponga, y por darme siempre otro punto de vista y hacerme ver que “la ciencia no es un desfile de militares”. Siempre le estaré también muy agradecida por cuidarnos, defendernos, apoyarnos e intentar mantenernos a todos unidos.*

*Gracias a la Dra. Mayte Parra Catalán, al Dr. Juan Luis Santos, al Dr. Jesús Page Utrilla, al Dr. Alberto Viera Vicario y a Roberto de la Fuente Pita por ayudarme en este largo camino, resolver mis dudas, guiarme y transmitirme sus conocimientos. Y por supuesto, gracias también por vuestra amistad. En especial gracias Mayte por orientarnos a todos, gracias Juan Luis por ser una gran referencia, admiro tu ilusión por el trabajo después e tantos años, gracias Alberto por ser muchas veces mi “enciclopedia particular”, gracias Jesús por tu didáctica magistral, y gracias Rober por enseñarme tantos trucos útiles. Marta Cifuentes Ochoa, no me olvido de ti, los comienzos no hubieran sido los mismos sin tu compañía y tu amistad. Quiero además expresar mi gratitud de manera especial a mi gran amiga y compañera Adela Calvente Arroyo, porque sin ella esta andadura no hubiera sido ni tan bonita ni tan divertida.*

*Agradezco también al Dr. Carlos García de la Vega por iniciarme en el mundo de la citogenética y el haber sido un excelente profesor en mi etapa de licenciatura y cursos de doctorado. Gracias también a otros excelentes docentes como la Dra. Ángeles Juarranz, el Dr. Carlos Sentís, el Dr. José Martín y el Dr. Carlos Montes, pues disfruté muchísimo con sus asignaturas. Todos ellos ayudaron a despertar mi vocación docente e investigadora.*

*Agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia, a la Universidad Autónoma de Madrid y a la Fundación Francisco Cobos el haberme concedido la financiación necesaria para la realización de este trabajo.*

*Gracias a todas las personas que generosamente nos han brindado anticuerpos y protocolos, pues sin su ayuda nuestro trabajo no podría haberse realizado. En especial, quiero agradecer al Dr. José Luis Barbero su generosidad durante tantos años y a su doctoranda, Ana Cuadrado, por enseñarme sus trucos.*

*Gracias también a las personas que nos han cedido animales para su estudio, especialmente agradezco al Dr. Kim Nasmyth, al Dr. Shyam K. Sharan y al Dr. Alberto M. Pendás el envío de los ratones que tan útiles son han sido para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.*

*Gracias a todos mis amigos, por hacerme pasar tan buenos ratos en nuestras reuniones y barbacoas, y por estar siempre pendientes de preguntarme qué tal va el intrigante mundo de esa cosa tan rara que es la meiosis.*

*Y por supuesto quiero expresar mi cariño a mi familia, pues con Tesis o sin ella, son lo más importante de nuestras vidas. Gracias a mis padres, Elena y Amadeo, por luchar siempre por mí, por darme un cariño infinito y por apoyarme en todas mis decisiones. Gracias en especial a ti mamá, pues siempre me has animado a realizar el doctorado, porque siempre estás ahí y porque sé que sin tu ayuda nunca hubiera sido posible. Gracias a mi abuela M<sup>a</sup> Luisa y a mis hermanos Carmen y Amadeo, a los que siempre puedo acudir si lo necesito y que me demuestran una y otra vez su gran generosidad. Gracias tía Luisa por tu ayuda. Gracias a mi suegra Anne por demostrar siempre su interés por lo que hago y por su gran apoyo.*

*Y por último mil gracias y todo mi amor a Iain y a nuestros hijos: José, Elena, Sean y la pequeñina que está por llegar, porque ellos son sin duda alguna quienes iluminan mi vida.*

*Hay quien dijo que el arte de la ciencia es repasar el camino, mirar lo que otros miraron y ver lo que otros no vieron, y que para ser un buen científico debo afirmar sólo lo que veo y quizás negar lo que creo. Durante estos años de doctorado y guiada por excelentes maestros, éste ha sido mi mayor aprendizaje.*



---

## ***Abreviaturas***





## ABREVIATURAS

**ACA**, anticuerpo anti-centrómero  
**APC**, complejo promotor de la anafase (*“Anaphase Promoting Complex”*)  
**ATPasa**, enzima de hidrólisis del adenosín trifostato  
**BSA**, albúmina de suero fetal bovino  
**CENP**, proteína centromérica  
**CLIPs**, *“Chromatid Linking Proteins”*  
**cms**, centímetros  
**CS**, complejo sinaptonémico  
**DAPI**, 4', 6-diamidino-2-fenilindol  
**DMEM**, *“Dulbecco's Modified Eagle's Medium”*  
**DMSO**, dimetil sulfóxido  
**DNA**, ácido desoxirribonucleico  
**DSBs**, roturas de doble cadena de DNA (*“Double-Strand Breaks”*)  
**EAs**, elementos axiales del complejo sinaptonémico  
**EC**, elemento central del complejo sinaptonémico  
**ELs**, elementos laterales del complejo sinaptonémico  
**EN**, envoltura nuclear  
**ET**, etopósido (Glucósido de Dimetil Epipodofilotoxina Etilidina)  
**Fab**, fragmento de inmunoglobulinas que contiene los dominios responsables de la unión antígeno-anticuerpo  
**Fig**, figura  
**FITC**, isotiocianato de fluoresceína  
**FRAP**, técnica de microscopía de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueado (*“Fluorescence Recovery After Photobleaching”*)  
**g**, gramos  
**GFP**, proteína verde fluorescente (*“Green Fluorescent Protein”*)  
**IgG**, inmunoglobulina tipo G  
**IgM**, inmunoglobulina tipo M  
**INCENP**, proteína centromérica interna  
**KD**, mutante genético que tiene suprimida la funcionalidad de un gen concreto (*“KnockDown”*)  
**kDa**, kilodalton  
**KLP**, *“Kinesin Like Protein”*  
**KO**, mutante genético al que se le ha eliminado un gen concreto (*“KnockOut”*)  
**kV**, kilovoltios  
**l**, litro  
**M**, molar  
**mA**, miliamperio  
**MCAK**, quinesina mitótica asociada al centrómero (*“Mitotic Centromere-Associated Kinesin”*)  
**mg**, miligramo  
**ml**, mililitro  
**mM**, milimolar  
**MTs**, microtúbulos  
**µm**, micrómetro  
**N**, normal  
**nm**, nanómetros

**PAR**, región pseudoautosómica (“*Pseudoautosomal Region*”)

**Pb**, pares de bases

**PBS**, tampón fosfato salino

**PLK**, “*Polo Like Kinase*”

**RBS/SC**, síndrome del focomelia de Roberts

**RNA**, ácido ribonucleico

**RNAi**, ácido ribonucleico de interferencia

**SAC**, punto de control mitótico (“*Spindle Assembly Checkpoint*”)

**SCC**, cohesión entre cromátidas hermanas (“*Sister Chromatid Cohesion*”)

**SDS**, solución de solubilización (dodecil sulfato sódico)

**SGO**, Shugoshina

**SMC**, proteína de mantenimiento de la estructura cromosómica (“*Structural Maintenance of Chromosomes*”)

**SUMO**, “*Small Ubiquitin related MOdifiers*”

**SYCP**, proteína del complejo sinaptonémico (“*SYnaptonemal Complex Protein*”)

**Topo II**, DNA topoisomerasa II $\alpha$

**TR**, Texas red

**TUNEL**, “*TdT-mediated dUTP-X Nick End Labeling*”

**V**, voltio

## *Índice*





<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>1. La meiosis</b>	9
1.1. Primera división meiótica	10
1.1.1. El complejo sinaptonémico	12
1.2. Segunda división meiótica	14
<b>2. La cohesión entre cromátidas hermanas mediada por proteínas</b>	18
2.1. Mitosis	19
2.1.1. Composición y estructura del complejo de cohesina mitótico	19
2.1.2. Carga de los complejos de cohesina y establecimiento de la cohesión	22
2.1.3. Dinámica de los complejos de cohesina en mitosis	25
2.1.3.1. Disociación parcial de cohesinas en la profase de vertebrados	26
2.1.3.2. Liberación de la cohesión durante la transición metafase-anafase	26
2.1.4. Regulación de la cohesión centromérica en mitosis	29
2.1.5. Cofactores del complejo de cohesina mitótico	32
2.2. Meiosis	34
2.2.1. Los complejos de cohesina meióticos	34
2.2.2. Dinámica de los complejos de cohesina en meiosis	35
2.2.2.1. Disociación parcial de cohesinas en profase-I	36
2.2.2.2. Liberación diferencial de la cohesión entre cromátidas hermanas en meiosis	37
2.2.3. Regulación de la cohesión centromérica en meiosis	38
2.2.4. Cofactores de los complejos de cohesina meióticos	40
2.3. Otras funciones del complejo de cohesina	41
<b>3. La cohesión entre cromátidas hermanas mediada por concatenaciones de DNA</b>	43
3.1. Concatenación/Decatenación de moléculas de DNA	43
3.2. La DNA Topoisomerasa II $\alpha$	43
3.3. Regulación de la función de Topo II	45
<b>OBJETIVOS</b>	49
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	53
<b>1. Material</b>	55
1.1. Animales	55
1.2. Cultivos y líneas celulares	56
<b>2. Métodos</b>	57
2.1. Obtención de espermatoцитos	57
2.1.1. Aplastado de túbulos seminíferos	57
2.1.2. Esparcido de espermatoцитos	58
2.2. Utilización de células de cultivos celulares	59
2.3. Inmunolocalización de proteínas	59
2.4. Técnicas de inhibición	66
2.4.1. Inyecciones intraperitoneales de colchicina	66
2.4.2. Inyecciones intraperitoneales de Etopósido	66
2.5. Ensayo TUNEL	66
2.6. Electroforesis y <i>Western Blot</i>	67
2.6.1. Técnica de extracción de proteína de testículo de ratón	67
2.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	68
2.6.3. <i>Western Blot</i>	69
2.7. Inmunoprecipitación	70
2.8. Captura y procesamiento de imágenes	72

<b>RESULTADOS</b>	73
<u>1. Dinámica de SYCP3 y cinetocoros en la meiosis de ratón</u>	75
1.1. Primera división meiótica	76
1.2. Segunda división meiótica	81
<u>2. Localización de las cohesinas en la meiosis de ratón</u>	84
2.1. Distribución de REC8	84
2.1.1. Primera división meiótica	84
2.1.2. Segunda división meiótica	87
2.2. Distribución de RAD21	88
2.2.1. Primera división meiótica	88
2.2.2. Segunda división meiótica	91
2.2.3. Identificación de las divisiones meióticas mediante marcaje de $\alpha$ -tubulina	95
2.3. Distribución relativa de RAD21 y REC8	98
2.4. Distribución de SMC3	108
2.5. Distribución de STAG3	110
<u>3. Localización de los cofactores del complejo de cohesina</u>	111
3.1. Distribución de PDS5B	112
3.2. Distribución de WAPL	114
<u>4. Localización de SGOL2</u>	116
4.1. Primera división meiótica	116
4.2. Segunda división meiótica	120
4.3. Mitosis	126
4.3.1. Distribución de SGOL2 en células 3T3 de ratón	127
4.3.2. Distribución de SGOL2 en células HeLa humanas	130
<u>5. Estudio del modelo de ratón mutante para <i>sgol2</i></u>	133
5.1. Análisis de la meiosis en ratones macho <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	133
5.2. Dinámica de la proteína SYCP3 en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	141
5.3. Dinámica de las cohesinas en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	144
5.3.1. Distribución de REC8 en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	144
5.3.2. Distribución de SMC3 en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	146
5.4. Estudio de proteínas implicadas en la entrada en anafase en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	146
5.4.1. Distribución de CENP-E en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	147
5.4.2. Distribución de BubR1 en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	149
5.5. Dinámica de $\alpha$ -Tubulina en el mutante <i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>	150
<u>6. Análisis de la distribución de Topo II</u>	153
6.1. Primera división meiótica	153
6.2. Segunda división meiótica	153
6.3. Mitosis espermatogonial	156
6.4. Distribución relativa de Topo II y SYCP3	157
6.5. Distribución relativa de Topo II y otras proteínas	162
6.6. Análisis de espermatocitos de ratón tratados con Etopósido	164
6.6.1. Estudio cuantitativo de los efectos del ET sobre la meiosis de ratón	174
6.6.2. Ensayo TUNEL	177
6.7. Distribución de proteínas reguladoras de Topo II	178
<u>7. Distribución de Ciclina A</u>	181
<u>8. Estudio de un modelo de ratón con univalentes en metafase-I: análisis del ratón mutante para <i>rad51c</i></u>	186
8.1. Análisis de la meiosis de mutantes <i>Rad51c</i> <sup>ko/neo</sup>	186
8.2. Análisis de diferentes proteínas en mutantes <i>Rad51c</i> <sup>ko/neo</sup>	189



<b>DISCUSIÓN</b>	193
<u>1. El complejo de cohesina. Distribución y funciones en espermatocitos de ratón</u>	195
1.1. Primera división meiótica	195
1.1.1. El complejo sinaptonémico y el eje de cohesinas	196
1.1.2. Disociación parcial de las cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase-I	197
1.1.3. Acumulación de RAD21 en las regiones centroméricas	203
1.1.4. Distribución de las cohesinas en bivalentes en metafase-I	204
1.1.4.1. Cohesión intercinetocórica y centromérica	205
1.1.4.2. Cohesión braquial	210
1.2. Segunda división meiótica	212
1.2.1. Presencia/ausencia de cohesinas en metafase-II	212
1.3. Existencia de diferentes complejos de cohesina	214
<u>2. Regulación de la cohesión centromérica. La importancia de las Shugoshinas</u>	219
2.1. SGOL2 como protectora de la cohesión centromérica	219
2.2. SGOL2 como sensora de tensión	221
2.3. Estudio del modelo de ratón mutante para sgol2	224
<u>3. Implicación de Topo II en la meiosis de ratón</u>	231
3.1. Dinámica y funciones de Topo II	231
3.2. Efectos de la inhibición de Topo II	234
3.3. Regulación de la actividad decatenadora de Topo II	237
<u>4. La cohesión en los univalentes en metafase-I</u>	240
<u>5. Modelo de segregación en la meiosis de ratón</u>	247
<b>CONCLUSIONES</b>	253
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b>	257
<b>REFERENCIAS</b>	261



---

***Resumen***





## RESUMEN

El fenómeno de la cohesión entre cromátidas hermanas ha tomado gran relevancia en los últimos años dentro de los estudios sobre división celular, puesto que es un fenómeno esencial para el correcto desarrollo tanto de la mitosis como de la meiosis.

Durante la replicación del DNA, las dos cromátidas hermanas quedan íntimamente unidas por concatenaciones entre las hebras de DNA y además mediante un complejo proteico denominado complejo de cohesina. Por un lado, esas concatenaciones han de ser resueltas por proteínas específicas, como es el caso de la DNA Topoisomerasa II $\alpha$ , que se encarguen de liberar los “nudos” entre las moléculas de DNA que se han producido durante la replicación. Por otro lado, los fenómenos de carga y liberación de los diferentes complejos de cohesina han de estar minuciosamente regulados para que la liberación de la cohesión entre las cromátidas hermanas sea espacial y temporalmente adecuada. De no existir la cohesión entre cromátidas hermanas nunca tendríamos cromosomas formados por sus dos cromátidas hermanas cohesionadas en metafase, las cuales han de segregarse en anafase para conseguir un reparto equitativo del material genético en mitosis, y por tanto se impediría la persistencia de las líneas celulares. Durante la meiosis, la cohesión entre cromátidas hermanas es también un requisito fundamental para la correcta segregación cromosómica puesto que, junto a la formación de quiasmas, participa en el mantenimiento del bivalente como unidad funcional durante la primera división meiótica. La segregación en meiosis es diferencial, es decir, que ha de darse en dos pasos diferentes. Primero se produce una división reduccional de homólogos en la primera división meiótica, y más tarde una segregación ecuacional de cromátidas, similar a la mitótica, durante la segunda división meiótica que tiene por objetivo mantener constante el número cromosómico a través de las generaciones.

A pesar de los amplios conocimientos que se han ido obteniendo con respecto al fenómeno de cohesión entre cromátidas hermanas en los últimos años, los datos sobre la distribución de las subunidades que forman parte del complejo de cohesina, e incluso de la localización de la Topo II, en la meiosis de mamíferos son muy escasos. Utilizando como modelo experimental machos de la especie *Mus musculus* (ratón de laboratorio), esta memoria de Tesis Doctoral pretende aportar nuevos datos acerca de la aparición, composición, localización y dinámica de los complejos de cohesina durante las dos divisiones meióticas. Nuestros datos demuestran la existencia de múltiples complejos de

cohesina con distintas distribuciones y dinámicas durante la meiosis de ratón. Además, también hemos analizado la dinámica de la proteína SGOL2, implicada en la protección de la cohesión de las regiones centroméricas, y de otras proteínas relacionadas con la cohesión pero que no forman parte de los complejos de cohesina. Por último, también hemos estudiado la distribución y posibles funciones de Topo II como proteína decatenadora de moléculas de DNA entre cromátidas hermanas, así como de ciertas proteínas reguladoras de la misma. Estos estudios se han llevado a cabo sobre individuos control y realizando pruebas de inhibición con la droga genotóxica Etopósido, con objeto de estudiar las consecuencias a corto plazo de la inhibición de la actividad de Topo II. Nuestros resultados apuntan a que la liberación de los complejos de cohesina en la transición metafase-II/anafase-II es previa a la decatenación de las moléculas de DNA entre las cromátidas hermanas.

Para realizar los estudios descriptivos de las proteínas implicadas en el mantenimiento y liberación de la cohesión entre cromátidas hermanas hemos utilizado las técnicas de aplastado y esparcido de túbulos seminíferos de ratón, obteniendo preparaciones de espermatocitos sobre los cuales se han detectado las proteínas a estudiar mediante inmunofluorescencia indirecta. En estos estudios hemos tomado como referencia las distribuciones de distintas proteínas centroméricas y cinetocóricas y de la proteína SYCP3 de los elementos axiales y laterales del complejo sinaptonémico para poder realizar dobles inmunolocalizaciones junto a todas las proteínas analizadas *de novo*. En concreto, la técnica de aplastado de espermatocitos nos ha resultado muy útil para el estudio de la distribución y dinámica de las proteínas analizadas, puesto que con este protocolo se obtienen monocapas de espermatocitos de ratón que son inmunoreactivos y que gracias a las características de la técnica mantienen el volumen celular y por tanto la relación espacial original de las estructuras celulares.

Afortunadamente, no sólo hemos podido estudiar el fenómeno de cohesión entre cromátidas hermanas en ratones normales, sino que también hemos tenido la suerte de poder analizar dos modelos mutantes. El primero ha sido el ratón mutante para la proteína SGOL2, responsable de la protección de la cohesión centromérica durante la primera de las divisiones meióticas. Los individuos mutantes para SGOL2 son infértiles puesto que sufren un bloqueo meiótico que inhabilita la formación de espermátidas viables. Nuestros resultados demuestran que la ausencia de SGOL2 provoca una pérdida prematura de la cohesión centromérica que desencadena la aparición de espermatocitos

en segunda división con todas las cromátidas sueltas incapaces de generar espermátidas viables. Por otro lado, también hemos podido disponer de ratones mutantes para la recombinasa RAD51C. Solicitamos estos ratones puesto que se había publicado con anterioridad que en ellos aparece un alto porcentaje de univalentes durante la primera división meiótica. Por este motivo pensamos que resultaría muy interesante estudiar si las proteínas relacionadas con la cohesión entre cromátidas hermanas permanecían intactas o no en este tipo de situaciones cromosómicas.

Con todos los resultados obtenidos hemos intentado elaborar un modelo que explique cómo se desarrolla el fenómeno de cohesión entre cromátidas hermanas en la meiosis de machos de ratón que englobe los dos procesos fundamentales implicados: la cohesión mediada por concatenaciones de DNA y la cohesión mediada por proteínas.





---

## ***Introducción***





## INTRODUCCIÓN

### **1. La meiosis**

La palabra meiosis deriva del griego “*meio*”, que significa reducción. Este término fue acuñado en 1905 por Farmer y Moore para denominar al proceso por el cual los organismos con reproducción sexual reducen a la mitad su número cromosómico para la formación de gametos (Farmer y Moore, 1905). Con este modelo de división celular se consigue la generación de células con una dotación cromosómica haploide (gametos) mediante una única ronda de replicación del DNA seguido por dos rondas de segregación cromosómica consecutivas. Con la fusión de dos gametos durante la fecundación se restaura el contenido diploide de los cromosomas en el cigoto y se origina un nuevo individuo que mantiene constante el número cromosómico de la especie a través de las generaciones.

Los meiocitos son aquellas células que cursan las divisiones meióticas y que provienen de unas células proliferativas llamadas gonias. En la meiosis masculina, que es el caso que nos concierne en esta memoria de Tesis Doctoral, las gonias se denominan espermatogonias y los meiocitos espermatoцитos. La población de espermatogonias se mantiene mediante divisiones mitóticas. Algunas de esas espermatogonias entrarán en el proceso de la espermatogénesis experimentando un número determinado de divisiones mitóticas con citocinesis incompleta, que forma un sincitio celular denominado cisto. Durante el último periodo replicativo, algunas de las espermatogonias del cisto experimentarán una única ronda de replicación premeiótica tras la cual cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas idénticas que se denominan hermanas, entrando posteriormente estas espermatogonias en meiosis denominándose a partir de ese momento espermatoцитos y sufriendo dos divisiones consecutivas.

Para que la meiosis acontezca correctamente han de llevarse a cabo varios procesos celulares importantes entre los que destacan el reconocimiento entre los cromosomas homólogos (apareamiento), su sinapsis (unión física mediante un complejo proteico), la recombinación (intercambio de material genético entre ambos), y una doble segregación, primero reduccional y luego ecuatorial, de los cromosomas (Petronczki y col., 2003). Debido a su duración, la meiosis ha sido tradicionalmente subdividida en

meiosis-I o primera división meiótica y meiosis-II o segunda división meiótica (Esquema 1).

### 1.1. Primera división meiótica

Durante la primera división meiótica los espermatocitos primarios pasan de tener una dotación cromosómica diploide ( $2n$ ) y carga  $4C$ , a convertirse en espermatocitos secundarios, los cuales son haploides ( $n$ ) y con carga  $2C$ .

La meiosis-I consta de cuatro etapas: profase-I, metafase-I, anafase-I y telofase-I.

**Profase-I.** Esta es la más larga de las etapas de la meiosis, representando casi el 90% de la duración total de la meiosis y llegando a durar en ratón alrededor de 3 semanas (Cobb y Handel, 1998). Durante este estadio los cromosomas homólogos que se encuentran anclados a la envoltura nuclear (EN) por sus extremos se aparearán y sinapsarán por medio del complejo sinaptonémico (CS) formando una estructura única de la meiosis denominada bivalente. Junto con la recombinación o intercambio de material genético, que también se lleva a cabo en esta etapa, la formación de bivalentes garantiza la correcta orientación y segregación posterior de los cromosomas homólogos. De forma paralela, se produce la progresiva compactación y condensación de la cromatina.

La profase-I meiótica se subdivide en cinco etapas: leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis (Esquema 1).

**Leptotena.** En esta etapa comienzan los procesos de búsqueda de homología de los cromosomas de modo que cada pareja de homólogos comienza a alinearse para posteriormente aparear en las regiones homólogas. Aparecen progresivamente los elementos axiales (EAs) del CS (ver epígrafe 1.1.1.) en cada uno de los cromosomas homólogos, los cuales están asociados a la EN. En la transición leptotena/cigotena los extremos cromosómicos, que se denominan telómeros, adquieren una conformación polarizada en el núcleo que recibe el nombre de “*bouquet*” (por la disposición semejante a un ramo de flores), la cual fomenta el apareamiento (Scherthan y col., 1996; Scherthan, 2001).

**Cigotena.** Los EAs aparecen en cada homólogo localizados lateralmente respecto a las cromátidas hermanas. Comienza la sinapsis o unión física entre homólogos que debe ser entendida como la asociación íntima de los cromosomas homólogos estando mediada su interacción por el CS de una forma dinámica y progresiva (ver Epígrafe

1.1.1). A partir de este momento los EAs pasan a denominarse ELs y sobre ellos se articula el ensamblaje de los filamentos transversos, que constituyen el elemento central (EC) del CS (Zickler y Kleckner, 1998). Los puntos de inicio de formación del CS varían entre especies. Así, mientras que en algunas ocurre desde los telómeros hacia las regiones intersticiales de los cromosomas, en otras comienza en las regiones intersticiales y en otras en diferentes puntos a la vez a lo largo de todo el cromosoma (Albini y Jones, 1987; Marec, 1996; del Cerro y col., 1997).

**Paquitena.** El CS como estructura tripartita totalmente formada se extiende ya en esta etapa a lo largo de los cromosomas homólogos (Westergaard y von Wettstein, 1972). Podemos hablar ya de sinapsis completa y por tanto de bivalentes, entendiendo este término como la asociación íntima entre homólogos. La sinapsis ocurre en toda la longitud de los autosomas y en la región pseudoautosómica (PAR) de los cromosomas sexuales.

Durante estas primeras etapas de la profase-I, también tienen lugar los procesos de recombinación, los cuales suponen la formación de dobles roturas en las cadenas de DNA, invasión y reparación de hebras, que generan un intercambio de regiones cromosómicas entre los cromosomas homólogos (Tease y Jones, 1978). La manifestación citológica de este intercambio recíproco del material genético entre cromosomas homólogos se denomina quiasma.

**Diplotena.** En esta etapa comienza progresivamente la desinapsis por la cual los cromosomas homólogos quedan exclusivamente asociados por la región del o de los quiasmas. Ha de existir al menos un quiasma por pareja de homólogos para asegurar la estructura del bivalente. La desinapsis supone el desensamblaje y procesado de los componentes del CS. Existen diferentes modelos que explican este fenómeno, como son la formación de policomplejos en ortópteros o la degradación de masas amorfas formadas por componentes del CS en hemípteros (John, 1990). En mamíferos los ELs son detectables sobre los homólogos hasta el final de esta etapa e incluso en diacinesis.

**Diacinesis.** En esta última etapa de la profase-I se produce la desorganización de la EN concomitantemente a la avanzada condensación cromosómica.

**Prometáfase-I.** En esta etapa los bivalentes comienzan la biorientación a polos opuestos congregando hacia la placa ecuatorial, proceso que está condicionado por tres requisitos indispensables. El primero consiste en que los cinetocoros hermanos de cada cromosoma homólogo aparecen íntimamente asociados y comienzan a interactuar con

los microtúbulos (MTs) como una única unidad funcional (cohesión intercinetocórica). De este modo pueden orientar sintéticamente, es decir, ambos cinetocoros hermanos de cada cromosoma orientados a un mismo polo. El segundo requisito es que debe existir al menos un quiasma por bivalente, y el tercero es que las cromátidas hermanas han de estar cohesionadas a lo largo de todo el dominio intercromatídico para mantener la arquitectura del bivalente.

**Metafase-I.** En esta etapa los bivalentes están biorientados a polos opuestos y situados en la placa ecuatorial.

**Anafase-I.** A lo largo de esta etapa se lleva a cabo la segregación de un juego completo de cromosomas recombinados hacia cada polo opuesto de la célula.

**Telofase-I.** Los juegos de cromosomas llegan a polos opuestos de la célula traccionados por la fuerza de los MTs y su cromatina va progresivamente descondensándose. Se trata de una división reduccional ya que se reduce el número cromosómico de la especie a la mitad y genera al final de esta fase dos células con una dotación cromosómica haploide ( $n$ ) y carga cromosómica  $2C$ , pues cada uno de los cromosomas del juego porta dos cromátidas.

### 1.1.1. El complejo sinaptonémico

El complejo sinaptonémico (CS) es una estructura proteica localizada entre los cromosomas homólogos cuya función es mantenerlos unidos físicamente (Fawcett, 1956; Moses, 1956; Heyting, 1996; Zickler, 1999; Zickler y Kleckner, 1999; Page y Hawley, 2004). La dinámica de ensamblaje del CS se describió por primera vez en hongos del género *Neotiella* (von Wettstein y col., 1984) y está integrada en la subdivisión por etapas de la profase-I (Esquema 2).

El CS es una estructura proteica tripartita que se forma a partir de la asociación de dos elementos axiales cromosómicos denominados elementos laterales (ELs). Los ELs se estructuran uno por cromosoma homólogo y paralelos entre sí por medio de una serie de filamentos transversos que constituyen el elemento central (EC) (Westergaard y von Wettstein, 1972). Durante la profase-I de multitud de especies los extremos de los ELs asociados a la EN presentan ensanchamientos con una morfología infundibuliforme que corresponden a las denominadas placas de asociación de los ELs a la EN (Esponda y Giménez-Martín, 1972).

Se han descrito y caracterizado varias de las proteínas que conforman el CS en diferentes especies (Page y Hawley, 2004). En concreto en mamíferos se han caracterizado varias proteínas de los ELs, entre ellas las proteínas SYCP2 y SYCP3 (*Synaptonemal Complex Protein*). La localización de la proteína SYCP3 en rata y ratón (Moens y col., 1987; Lammers y col., 1994) y en hámster donde se llama Cor1 (Dobson y col., 1994), se ha estudiado principalmente con técnicas de esparcido y sobre cortes de testículos congelados. Nuestro grupo investigador describió también que SYCP3 aparece en los EAs /ELs del CS en espermatocitos de ratón mediante la técnica de aplastado de túbulos seminíferos de ratón (Parra y col., 2004). Los resultados publicados demuestran también que tanto SYCP2 (Schalk y col., 1998; Parra y col., 2004) como SYCP3 (Moens y Spyropoulos, 1995; Parra y col., 2004) colocalizan a lo largo de los EAs y ELs del CS durante la profase-I y en los centrómeros y brazos de los cromosomas homólogos en metafase-I. Se ha descrito que SYCP3 se pierde de los brazos en anafase-I pero persiste en el centrómero hasta la metafase-II (Moens y Spyropoulos, 1995; Eijpe y col., 2000; Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003). Sin embargo, Parra y col. (2004) han demostrado que en espermatocitos de ratón SYCP3 permanece en los centrómeros hasta la intercinesis (ver epígrafe 1.2. para descripción de esta etapa). El componente principal del EC es la proteína SYCP1, la cual forma los filamentos transversos y sólo es detectable entre los ELs de los dos homólogos en aquellas regiones cromosómicas sinapsadas, estando por tanto su distribución temporal acotada en las etapas en las que existe sinapsis entre los homólogos, es decir entre cigotena y diplotena (Meuwissen y col., 1992; Liu y col., 1996). Recientemente, se han descrito otras proteínas de la región central del EC como son SYCE1, SYCE2 y TEX12 (Costa y col., 2006; Hamer y col., 2006).

En los últimos años se ha demostrado que ninguna de las proteínas del CS es necesaria para el desarrollo embrionario ni postnatal, puesto que existen modelos de ratón mutantes para las mismas que no presentan ninguna anomalía somática. Sin embargo, estos individuos son estériles ya que la pérdida de función de estos genes, particularmente de SYCP3 (Yuan y col., 2000; Pelttari y col., 2001) y SYCP1 (Bolcun-Filas y col., 2009), acarrear graves desórdenes de la meiosis.

## 1.2. Segunda división meiótica

Durante la segunda división meiótica los espermatocitos secundarios mantienen la dotación cromosómica haploide ( $n$ ) pero reducen su carga de  $2C$  a  $C$ , de modo que se convierten en espermátidas, que tras las diferentes etapas de maduración de la espermiogénesis darán lugar a los espermatozoides.

Antes de comenzar la meiosis-II tiene lugar una interfase denominada **intercinesis**, la cual es una etapa particularmente poco estudiada en la meiosis de mamíferos, y en la cual, a diferencia de la interfase previa a la meiosis-I, no se produce ninguna ronda de replicación del DNA.

La meiosis-II consta a su vez de cuatro etapas: profase-II, metafase-II, anafase-II y telofase-II (Esquema 1).

**Profase-II.** En este estadio se produce la recondensación progresiva de los cromosomas y la EN se desorganiza en último término.

**Prometafase-II.** En esta etapa se producen los movimientos de congregación de los cromosomas hacia la placa ecuatorial. Los cinetocoros hermanos aparecen individualizados y adquieren, al igual que en la mitosis, una orientación anfitélica en la placa ecuatorial de modo que cada cinetocoro hermano orienta a un polo opuesto de la célula.

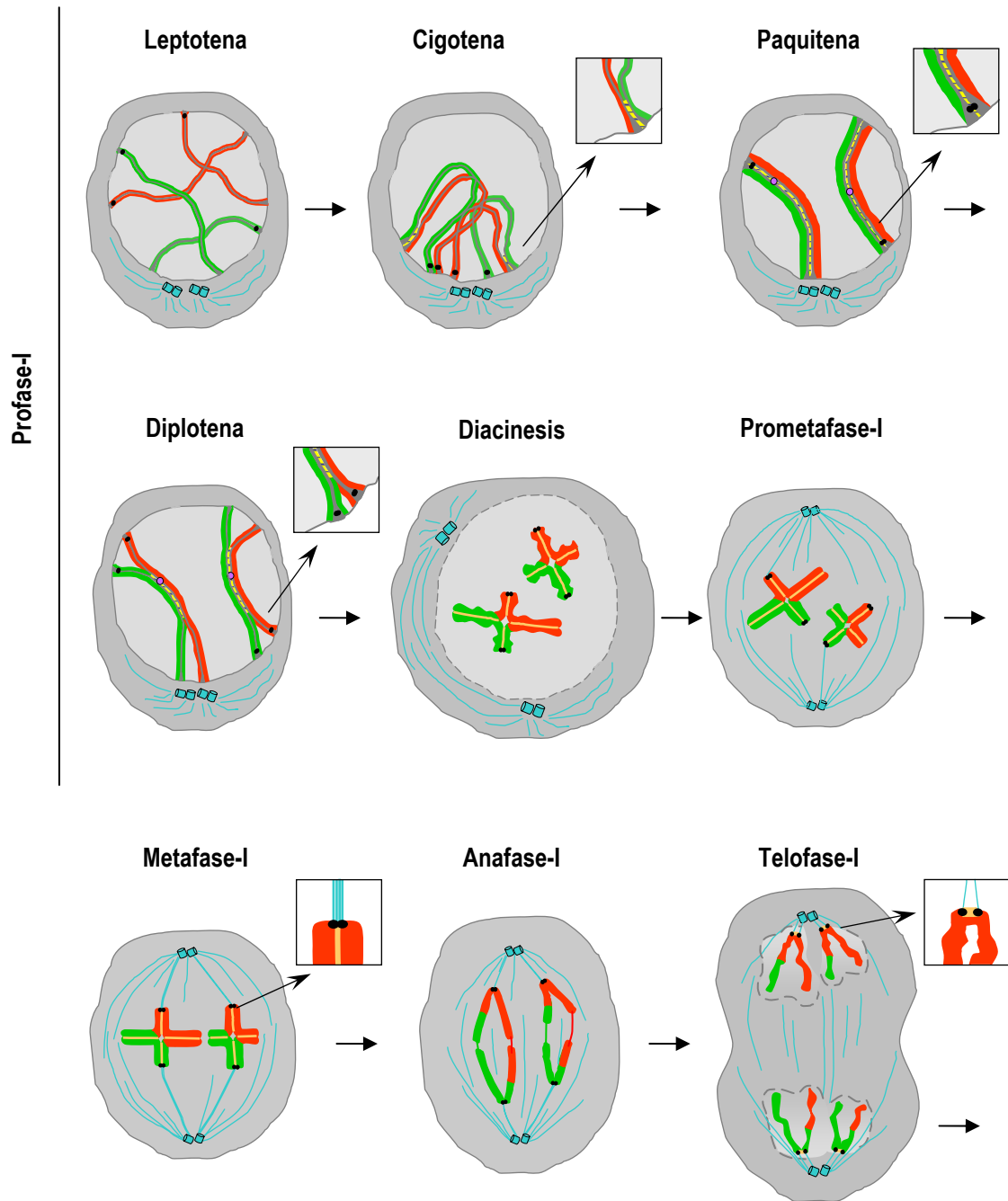
**Metafase-II.** En esta etapa los cromosomas están alineados en la placa ecuatorial manteniendo sus cinetocoros hermanos interaccionando con MTs que provienen de polos opuestos de la célula.

**Anafase-II.** Las cromátidas hermanas recombinadas son traccionadas por los MTs y segregan hacia polos opuestos. Al igual que ocurre en mitosis, en este caso se trata de una segregación ecuacional.

**Telofase-II.** Las cromátidas recombinadas completan su segregación cuando llegan a polos opuestos de la célula. En esta etapa se descondensa la cromatina y se reorganiza la EN para la posterior diferenciación y especialización de dichas células como gametos funcionales. Esta segunda división meiótica supone una división similar a la mitosis, puesto que mantiene constante el número de cromosomas presente en la célula ( $n$ ), pero que reduce la carga cromosómica a  $C$ , es decir, a una cromátida por cada cromosoma.

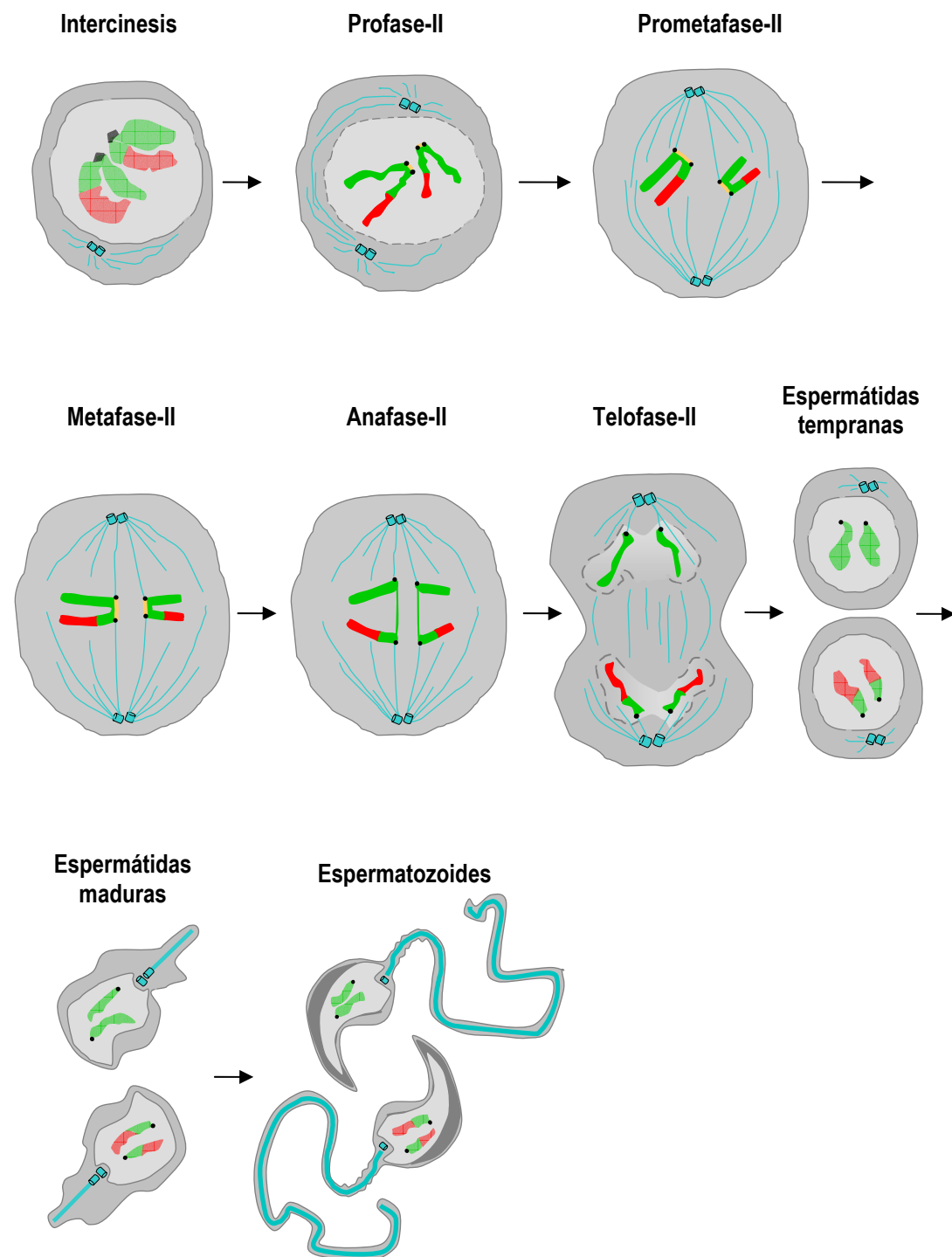


Primera división meiótica

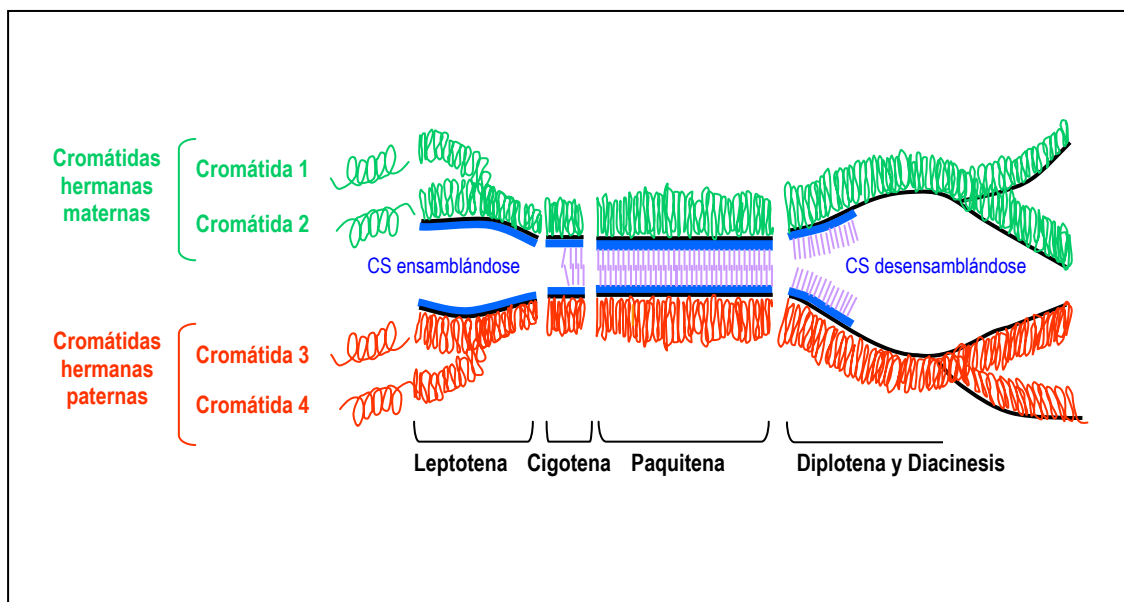


Segunda división meiótica

---



◀ **Esquema 1.** Esquema representativo de las diferentes etapas de la división meiótica. El juego de cromosomas paternos se representa en rojo y los maternos en verde. Se muestra el esquema de la meiosis para dos parejas de cromosomas homólogos telocéntricos, uno de mayor tamaño con un quiasma proximal y otro de menor tamaño con un quiasma intersticial. El citoplasma se ha representado en color gris oscuro y los núcleos en gris claro. Los microtúbulos y los centriolos se han dibujado en azul. Los cinetocoros se han representado como esferas negras. En las etapas de la profase los EAs de los cromosomas y los ELs del CS se han dibujado en azul, y el EC en amarillo. En el detalle aumentado de las etapas de cigotena, paquitena y diplotena se muestran los engrosamientos de los ELs denominados placas de asociación. Los nódulos de recombinación tardíos sobre el punto de quiasma en las etapas de paquitena y diplotena se han representado como esferas de color rosa. En diacinesis, prometafase-I y metafase-I se ha representado la cohesión braquial entre las cromátidas hermanas en color amarillo. En el detalle aumentado del bivalente en metafase-I y telofase-I se representa la orientación sintética de los cinetocoros hermanos y la cohesión centromérica en profase-II, prometafase-II y metafase-II se ha representado en amarillo. Las concatenaciones de DNA entre las cromátidas hermanas en anafase-II se han representado como finas hebras que conectan los cinetocoros hermanos. La desorganización de la EN en diacinesis y la reorganización de la misma en telofase-I y telofase-II se ha representado con una línea gris discontinua.



**Esquema 2.** Dinámica del complejo sinaptonémico durante la meiosis. Las cromátidas hermanas del juego cromosómico materno se han representado en verde, y las del juego paterno en rojo. Los ELs del CS se han representado en azul y el EC en violeta. Este esquema ha sido adaptado de *Molecular Biology of the Cell* 5/e (Garland Science 2008).

## **2. La cohesión entre cromátidas hermanas mediada por proteínas**

Entre los mecanismos que contribuyen a asegurar la correcta herencia genética tanto en la mitosis como en la meiosis se encuentra el fenómeno de la cohesión entre cromátidas hermanas que implica el establecimiento de la unión física entre las dos cromátidas de cada cromosoma resultantes de la duplicación genómica. Los fallos que se produzcan en el establecimiento, mantenimiento y disolución de la cohesión entre cromátidas hermanas alterarán la segregación cromosómica y pueden generar aneuploidías o incluso entrada en apoptosis o muerte celular programada.

En mitosis, la cohesión entre cromátidas hermanas se establece en el momento de la replicación, durante la fase S de la interfase (Miyazaki y Orr-Weaver, 1994) y persiste hasta la entrada en anafase. El modo en que las cromátidas hermanas permanecen unidas hasta su segregación ha sido un interesante debate científico en los últimos años. En un primer momento se postuló que las cromátidas hermanas permanecen unidas por la región centromérica hasta el inicio de la anafase mitótica (Darlington, 1932), conociéndose este modelo como “Teoría de la replicación tardía del centrómero”. Este modelo sugiere que en mitosis, en concreto al final de la metafase, se observa cierta actividad replicativa que desencadenaría en la aparición de cinetocoros dobles, gracias a los cuales los cromosomas podrían biorientar y migrar las cromátidas hermanas a ambos polos celulares (Tschumper y Carbon, 1983; Murray y Szostak, 1985). Curiosamente, la replicación completa del centrómero antes del final del periodo S se había ya demostrado previamente a la publicación del trabajo de Murray y col. en diferentes especies (Schrader, 1939; Taylor, 1960; Lima-de-Faria y Jaworska, 1968; Crossen y col., 1975; McCarroll y Fangman, 1988). Por otro lado, este modelo queda descartado también con la existencia de diversos trabajos de investigación que demuestran que no existe ningún indicio de replicación de pequeños fragmentos de DNA durante la metafase (Comings, 1966; Crossen y col., 1975; Collins y Newlon, 1994; Moore y Orr-Weaver, 1998).

Desde que la Teoría de la replicación tardía del centrómero quedó descartada, comenzaron a fortificarse dos hipótesis estrechamente relacionadas. Una postula que las cromátidas hermanas quedan unidas tras la replicación por concatenaciones de DNA (Murray y Szostak, 1985), y otra propone que un complejo proteico las mantiene unidas desde el momento de su formación (Uhlmann, 2003a).

Existen diversas proteínas que fueron implicadas en la cohesión entre cromátidas hermanas. Una de ellas es la proteína pasajera del centrómero INCENP (*INner CENtromeric Protein*) (Cooke y col., 1987), y otras las denominadas CLIPs (*Chromatid Linking Proteins*) (Rattner y col., 1988), la mayoría de las cuales aparecen como una estructura filamentosa que atraviesa los centrómeros de cinetocoro a cinetocoro. Otros autores implican a la proteína pasajera del dominio interno del centrómero Aurora-B quinasa en la cohesión centromérica (Adams y col., 2001; Vagnarelli y Earnshaw, 2001). En este sentido, nuestro grupo investigador propuso que INCENP y Aurora-B podrían regular la cohesión centromérica entre cromátidas hermanas en la meiosis-II de machos de ratón (Parra y col., 2003). Otra proteína que fue implicada en cohesión, y cuyo estudio en meiosis está muy extendido, es SYCP3 (proteína estructural de los EAs/ELs del CS), pues fue localizada en los centrómeros hasta la anafase-II en rata (Dobson y col., 1994; Moens y Spyropoulos, 1995). Otras proteínas propuestas para participar en el fenómeno de la cohesión han sido Pimples y Three rows, las cuales aparecen en los centrómeros mitóticos de *Drosophila melanogaster* (Stratmann y Lehner, 1996; Allshire, 1997). La idea más apoyada actualmente sugiere que el fenómeno de cohesión entre cromátidas hermanas tanto en mitosis como en meiosis está regulado por un complejo multiproteico denominado complejo de cohesina (Marston y Amon, 2004; Nasmyth y Haering, 2005).

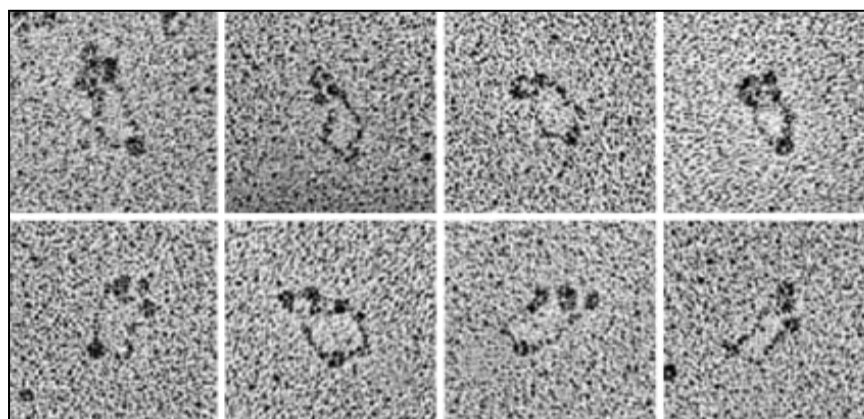
## 2.1. Mitosis

### 2.1.1. Composición y estructura del complejo de cohesina mitótico

El complejo de cohesina fue descrito por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* con la generación de mutantes que eran incapaces de mantener las cromátidas hermanas unidas hasta la anafase (Guacci y col., 1997; Michaelis y col., 1997; Toth y col., 1999), y fue posteriormente estudiado también en extractos de huevos de *Xenopus laevis* (Losada y col., 1998). Este complejo está compuesto por cuatro subunidades evolutivamente conservadas que a partir de este momento denominaremos como cohesinas: Smc1, Smc3, Scc1 y Scc3 (Tabla 1 y Esquema 3). Smc1 y Smc3 pertenecen a la familia de las SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) (Haering y col., 2002). La kleisina- $\alpha$  Scc1 (Guacci y col., 1997), así como la proteína con dominios de repetición HEAT Scc3 (Sumara y col., 2000) pertenecen a la familia SCC (*Sister*

*Chromatid Cohesion*). Las cohesinas ortólogas se han nombrado de modo diferente dependiendo de la especie de estudio conformando un juego de varias proteínas ortólogas (Tabla 1). Existen también otras proteínas que no forman parte del complejo de cohesina pero que están relacionadas con su dinámica y función y que llamaremos cofactores del complejo de cohesina (Peters y col., 2008). Los cofactores del complejo de cohesina que se conocen hasta el momento son PDS5, WAPL y Soronina (Esquema 3 y epígrafe 2.1.5.).

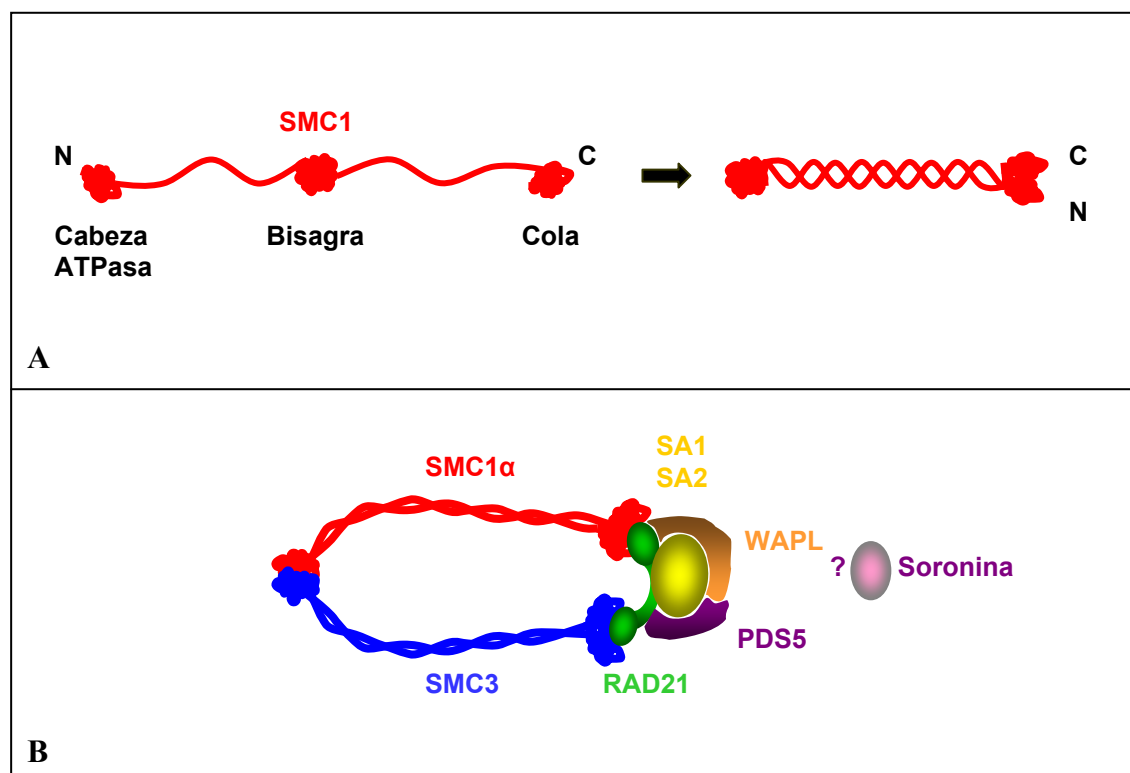
En el año 2002 se publicaron los primeros trabajos de investigación que hacían una aproximación a la arquitectura molecular de los complejos de cohesina. Estos ensayos se realizaron en células humanas (Anderson y col., 2002) y en *S. cerevisiae* (Haering y col., 2002), y ambos llegaron a la conclusión de que las cohesinas purificadas forman estructuras similares a una argolla detectable por microscopía electrónica (Imagen 1). Basándose en estos resultados y en otros ensayos bioquímicos, se ha propuesto que el complejo de cohesina forma un anillo. Las cohesinas SMC1 $\alpha$  y SMC3 constituyen una estructura larga cuyos extremos amino y carboxilo terminales se doblan sobre sí mismos para formar enrollamientos largos intermoleculares y antiparalelos de tipo *coiled-coil* de aproximadamente 45 nm (Melby y col., 1998; Haering y col., 2002) (Esquema 3A). Según este modelo SMC1 $\alpha$  y SMC3 conforman una estructura en forma de horquilla mediante la unión de sus dominios globulares en el centro de sus ejes de plegado. La kleisina  $\alpha$  RAD21 une las cabezas ATPasa de SMC1 $\alpha$  y SMC3 cerrando la horquilla y adquiriendo así un estructura en forma de anillo (Esquema 3B). La apertura del anillo para la liberación de la cohesión entre las cromátidas hermanas ocurre con el corte proteolítico de RAD21 (Hauf y col., 2001).



**Imagen 1.** Complejos de cohesina humanos purificados, sombreados y observados mediante microscopía electrónica de transmisión (Anderson y col., 2002).

COMPLEJO DE COHESINA			
<i>S. cerevisiae</i>		<i>Drosophila</i>	
Mitosis	Meiosis	Mitosis	Meiosis
<b>Smc1</b> <b>Smc3</b> <b>Scc1</b> <b>Scc3</b>	<b>Smc1</b> <b>Smc3</b> <b>Scc1 y Rec8</b> <b>Scc3</b>	<b>Smc1</b> <b>Smc3</b> <b>DRad21</b> <b>DSA1/SA2</b>	<b>Smc1</b> <b>Smc3</b> <b>C(2)M</b>
<i>S. pombe</i>		<i>Xenopus</i>	
Mitosis	Meiosis	Mitosis	Meiosis
<b>Psm1</b> <b>Psm3</b> <b>Rad21</b> <b>Psc3</b>	<b>Psm1</b> <b>Psm3</b> <b>Rad21 y Rec8</b> <b>Psc3 y Rec11</b>	<b>XSMC1</b> <b>XSMC3</b> <b>XRAD21</b> <b>XSA1/XSA2</b>	<b>XSMC1</b> <b>XSMC3</b> <b>XREC8</b>
<i>C. elegans</i>		Mamíferos	
Mitosis	Meiosis	Mitosis	Meiosis
<b>Him-1</b> <b>Smc3</b> <b>Coh-2/Scc1</b> <b>Scc3</b>	<b>Him-1</b> <b>Smc3</b> <b>Rec8</b> <b>Scc3</b>	<b>SMC1α</b> <b>SMC3</b> <b>RAD21</b> <b>SA1 y 2</b>	<b>SMC1α y SMC1β</b> <b>SMC3</b> <b>RAD21 y REC8</b> <b>STAG3</b>

**Tabla 1.** Composición de los complejos de cohesina en diferentes especies.



**Esquema 3.** Estructura del complejo de cohesina mitótico de mamíferos.

### 2.1.2. Carga de los complejos de cohesina y establecimiento de la cohesión

En primer lugar es necesario distinguir entre los términos carga de los complejos de cohesina y establecimiento de la cohesión. La carga de los complejos de cohesina es el proceso por el cual los complejos de cohesina se unen a la cromatina, a diferencia del fenómeno de establecimiento de la cohesión, que consiste en el momento en el cual las cromátidas hermanas comienzan a estar físicamente cohesionadas por los complejos de cohesina. Ambos procesos están regulados por diferentes factores y ocurren en momentos diferentes del ciclo celular.

Los complejos de cohesina comienzan a unirse a la cromatina durante la fase G1 de la interfase de *S. cerevisiae* (Guacci y col., 1997; Michaelis y col., 1997). En este organismo las cohesinas se localizan en lugares ricos en pares de bases A-T aunque se desconocen exactamente sus lugares de unión (Blat y Kleckner, 1999; Glynn y col., 2004). Sin embargo en vertebrados, la carga de cohesinas a la cromatina comienza ya en telofase (Losada y col., 1998; Darwiche y col., 1999; Sumara y col., 2000; Gerlich y col., 2006).



En todos los organismos estudiados hasta la fecha la carga de los complejos de cohesina al DNA depende del complejo de adherinas Scc2/Scc4 (Furuya y col., 1998; Ciosk y col., 2000; Gillespie y col., 2004; Takahashi y col., 2004; Bernard y col., 2006; Seitan y col., 2006; Watrin y col., 2006a; Watrin y col., 2006b). Evidencia indirecta de este proceso son los experimentos que demuestran la interacción *in vitro* entre fracciones de cohesina y el complejo Scc2/Scc4 en *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* y *X. laevis* (Toth y col., 1999; Takahashi y col., 2004; Gause y col., 2008). El modelo que intenta explicar la dinámica de acción del complejo Scc2/Scc4 para mediar la carga de cohesinas al DNA se ha estudiado en levaduras y propone que los dominios en codo de SMC1 $\alpha$  y SMC3 han de abrirse para promover la apertura del anillo y permitir el paso del DNA (Gruber y col., 2006; Hirano y Hirano, 2006), y que este proceso depende de la actividad ATPasa de las cabezas de estas cohesinas (Arumugam y col., 2003; Weitzer y col., 2003). El mecanismo molecular que explica cómo las cabezas ATPasa de SMC1 $\alpha$  y SMC3 pueden influir en la apertura del dominio en codo está aún por esclarecer, pero recientemente se ha demostrado en *S. cerevisiae* la interacción entre los dominios ATPasa y el dominio en codo de las SMCs entre sí (Mc Intyre y col., 2007).

En vertebrados, el complejo Scc2/Scc4 se disocia de los cromosomas durante la mitosis, demostrando que en este periodo no existe carga de nuevas cohesinas al DNA una vez finalizada la interfase (Gillespie y Hirano, 2004; Watrin y Peters, 2006). Sin embargo, en *S. cerevisiae* se ha sugerido recientemente que puede haber una recarga de cohesinas en los centrómeros durante la mitosis que es independiente de Scc2/Scc4 (Bausch y col., 2007; Ocampo-Hafalla y col., 2007). Existen además también otros trabajos realizados en *D. melanogaster* que también proponen que puede existir una nueva vía de carga de las cohesinas al DNA que sea independiente del complejo Scc2/Scc4 (Gause y col., 2008). Por lo tanto, ya que recientemente se están proponiendo modelos contrapuestos, y que los estudios en vertebrados son particularmente escasos, serán necesarios más estudios que esclarezcan la dinámica de unión de las cohesinas al DNA.

El establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas tiene por definición que llevarse a cabo en el momento de su formación, es decir, durante la replicación del DNA en la fase S de la interfase (Guacci y col., 1997; Michaelis y col., 1997). Se piensa que los complejos de cohesina que mantienen unidas las cromátidas hermanas desde el momento de su replicación son muy estables ya que tienen un nivel muy bajo de

intercambio con la fracción de proteína soluble (Haering y col., 2004), sin embargo se ha demostrado con ensayos FRAP y con cohesinas unidas a GFP que no toda la totalidad de las cohesinas nucleares se encuentran unidas a los cromosomas, sino que cierta cantidad permanecen activas en el nucleoplasma y que podrían estar desempeñando otras funciones diferentes a la cohesión (Gerlich y col., 2006).

El establecimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas está imprescindiblemente mediado por la acetiltransferasa Eco1/Ctf7p (Skibbens y col., 1999; Tanaka y col., 2000; Ivanov y Nasmyth, 2005; Unal y col., 2007). Este modelo está indirectamente demostrado con la interacción física entre Eco1 y diversas proteínas involucradas en la replicación del DNA (Kenna y Skibbens, 2003; Moldovan y col., 2006), e incluso se ha propuesto que en *S. cerevisiae* Eco1 se desplaza por el DNA paralela a la maquinaria de replicación (Lengronne y col., 2006). Interesantemente, esta enzima no es necesaria para la carga de cohesinas al DNA, ni tampoco una vez que se ha establecido la cohesión entre las cromátidas hermanas. En levaduras se ha demostrado recientemente que Eco1 es capaz de acetilar a la cohesina SMC3 en varios residuos de lisina que están localizados en su cabeza ATPasa, y que si este proceso se ve alterado ocurren errores en el establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas que desencadenan en la muerte celular (Unal y col., 2007; Ben-Shahar y col., 2008). Por otro lado, se ha publicado también un trabajo de investigación en el que mediante la depleción de una o varias de las proteínas ortólogas a Eco1 en células humanas (Esco1/Efo1 y Esco2/Efo2) se demuestra que en ausencia de estas proteínas también se producen errores en el establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas (Hou y Zou, 2005). Hasta el momento sólo se ha demostrado que Esco1 es capaz de acetilar a SMC3, pero también se sabe que ambas variantes, tanto Esco1 como Esco2, han de actuar conjuntamente para que el establecimiento de la cohesión en células humanas se lleve a cabo correctamente (Zhang y col., 2008b), sin embargo, existen aún muchas lagunas en el conocimiento de los mecanismos moleculares que rigen este proceso.

En la actualidad se desconoce todavía cómo los anillos de cohesina interaccionan con la cromatina en el momento de la replicación del DNA, ni cómo están estructurados los anillos para mantener la cohesión entre las cromátidas hermanas en cromosomas condensados. En los últimos años se han propuesto diferentes modelos que pueden ser clasificados en tres categorías: “un anillo”, “dos anillos” y “anillos en cadena” (Losada,

2007). En un primer momento, se propuso que un anillo de cohesina podría abrazar a ambas cromátidas hermanas (Nasmyth, 2001; Haering y Nasmyth, 2003; Nasmyth, 2005). Sin embargo, la propia topología de las moléculas haría esto imposible, ya que el complejo de cohesina tiene alrededor de 45 nm de largo y ambas cromátidas condensadas abarcarían 1400 nm. Por este motivo también se ha propuesto que “un anillo” de cohesina rodea sólo a bucles de cromatina provenientes de ambas cromátidas hermanas (Gruber y col., 2003; Ivanov y Nasmyth, 2005). Otros autores sugieren que la interacción entre “dos anillos” de cohesina es capaz de abrazar a las dos moléculas de DNA (Anderson y col., 2002; Campbell y Cohen-Fix, 2002; Stead y col., 2003; Huang y col., 2005; Nasmyth, 2005; Skibbens, 2005; Guacci, 2007; Skibbens y col., 2007). Por otro lado, el modelo de “anillos en cadena” sugiere que una molécula de RAD21 podría conectar varias horquillas de SMC1 $\alpha$ /SMC3 de manera que se formaría una cadena de varios complejos de cohesina que conectaría hebras de DNA provenientes de ambas cromátidas hermanas (Huang y col., 2005; Nasmyth y Haering, 2005). Recientemente se ha propuesto un nuevo modelo llamado “*Handcuff cohesin complexes*” o “complejos en esposa”, el cual es una modificación del modelo de “anillos en cadena” con el que se apuesta por una estructura tridimensional formada por dos complejos de cohesina unidos por sus subunidades RAD21 y que adquiere forma de esposas (Zhang y col., 2008b).

### 2.1.3. Dinámica de los complejos de cohesina en mitosis

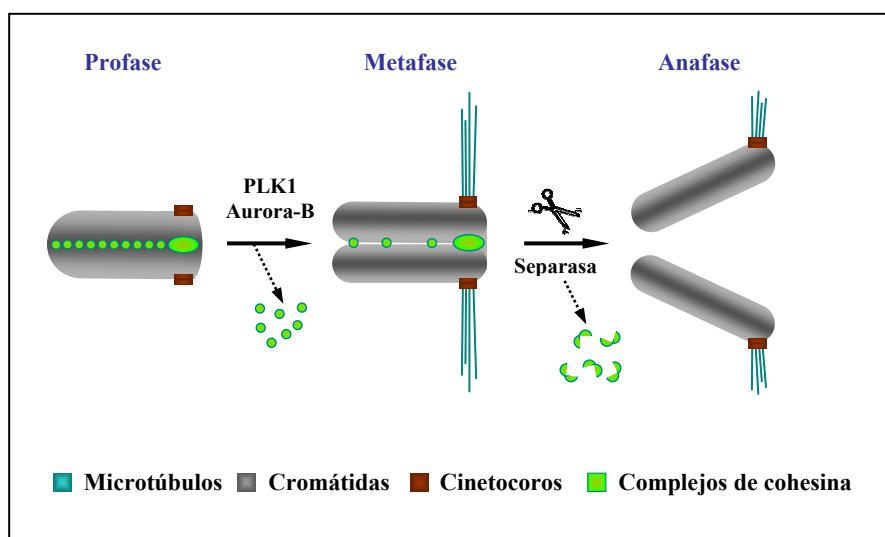
En mitosis existen dos vías de liberación de la cohesión que tienen lugar en dos momentos distintos de la división celular. En primer lugar, y únicamente en vertebrados, existe una disociación parcial de cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase que está mediada fundamentalmente por fosforilación. En segundo lugar, tanto en vertebrados como en levaduras, la liberación de la cohesión centromérica en la transición metafase-anafase se produce por la apertura de los anillos de cohesina mediada por la proteólisis de la subunidad SCC1/RAD21 del anillo de cohesinas por parte de una proteasa llamada Separasa.

De este modo, en la mitosis de *S. cerevisiae* la liberación de la cohesión en brazos y en el centrómero se producen al tiempo en la transición metafase-anafase (Ciosk y col., 2000). Sin embargo en vertebrados, primero se produce la liberación parcial de cohesinas de brazos durante la profase persistiendo cierta cantidad de complejos de

cohesina en la región braquial durante la metafase, y es en la transición metafase-anafase cuando, al igual que en levaduras, se resuelve la cohesión centromérica (Waizenegger y col., 2002; Giménez-Abián y col., 2004) (Esquemas 4 y 5).

### 2.1.3.1. Disociación parcial de cohesinas en la profase de vertebrados

En la mitosis de vertebrados se ha descrito que los complejos de cohesina se disocian parcialmente de los brazos durante la profase/prometáfase (Losada y col., 2000; Waizenegger y col., 2000; Warren y col., 2000; Gause y col., 2008). Esta disociación no es dependiente de Separasa, es decir, no implica la ruptura y degradación de los complejos de cohesina, sino que supone la liberación de los complejos de cohesina mediada por la fosforilación de la cohesina SA2 por las quinasas PLK1 y Aurora-B (Losada y col., 2002; Sumara y col., 2002; Uhlmann, 2003b; Hauf y col., 2005) (Esquema 4).



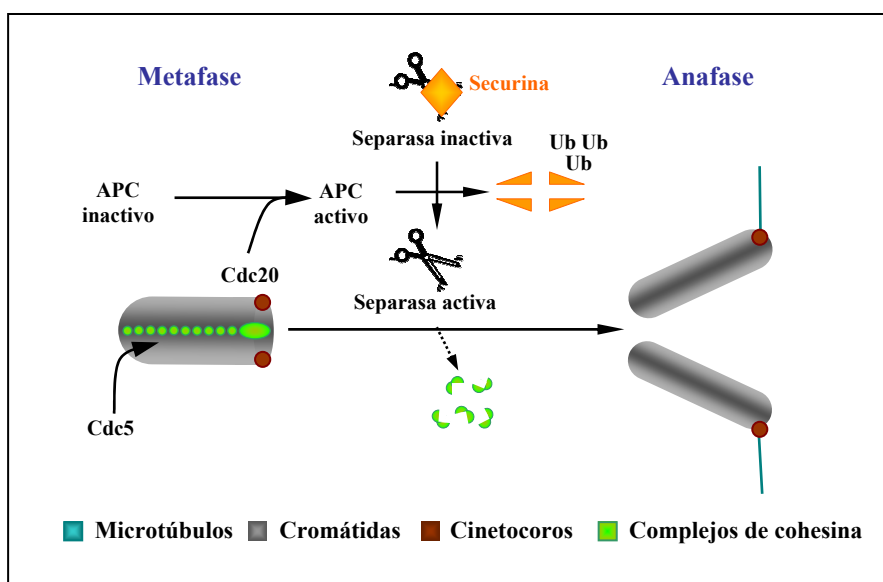
**Esquema 4.** Dinámica de la liberación de la cohesión en la mitosis de vertebrados.

### 2.1.3.2. Liberación de la cohesión durante la transición metafase-anafase

En la mitosis de *S. cerevisiae*, la liberación de la cohesión entre cromátidas hermanas se produce en la transición metafase-anafase con la activación del complejo promotor de la anafase APC (*Anaphase Promoting Complex*). En el momento en que todos los cromosomas se encuentran bien alineados en placa, el factor Cdc20 de los cinetocoros activa al APC (Peters, 2002) y con la activación del APC se produce la consecuente activación de la proteasa Separasa. La Separasa está regulada por la unión a

su inhibidor, la chaperona Securina (Hornig y col., 2002; Waizenegger y col., 2002), la cual es ubiquitinizada por el complejo APC activo y degradada en el proteasoma (Cohen-Fix y col., 1996; Funabiki y col., 1996). Con la activación del APC en la transición metafase-anafase la Separasa activa realiza dos cortes proteolíticos en SCC1 y promueve la apertura de los anillos de cohesina (Uhlmann y col., 1999; Uhlmann y col., 2000). Se ha propuesto también que Scc1 ha de estar previamente fosforilada por Cdc5 (ortóloga de PLK1) para su posterior proteolisis (Alexandru y col., 2001) (Esquema 5).

Aunque los estudios en la mitosis de *S. pombe* son más escasos, se ha demostrado también que la Separasa es indispensable para el corte proteolítico de Rad21 y por tanto para la resolución de las cromátidas hermanas mediante la apertura de los anillos del complejo de cohesina (Tomonaga y col., 2000).



**Esquema 5.** Dinámica de la liberación de la cohesión durante la transición metafase-anafase en la mitosis de *S. cerevisiae*.

Como hemos comentado, en la mitosis de vertebrados, parte de la cohesión entre cromátidas hermanas se libera durante la profase mediante la fosforilación de SA2 por las quinasas PLK1 y Aurora-B (Losada y col., 2000; Waizenegger y col., 2000; Warren y col., 2000; Gause y col., 2008). No obstante, persisten los complejos de cohesina centroméricos hasta que todos los cromosomas hayan alineado correctamente en la placa ecuatorial. El complejo APC se activa por el factor Cdc20 de los cinetocoros en la transición metafase-anafase (Peters, 2002) y se ha sugerido que en vertebrados actúa

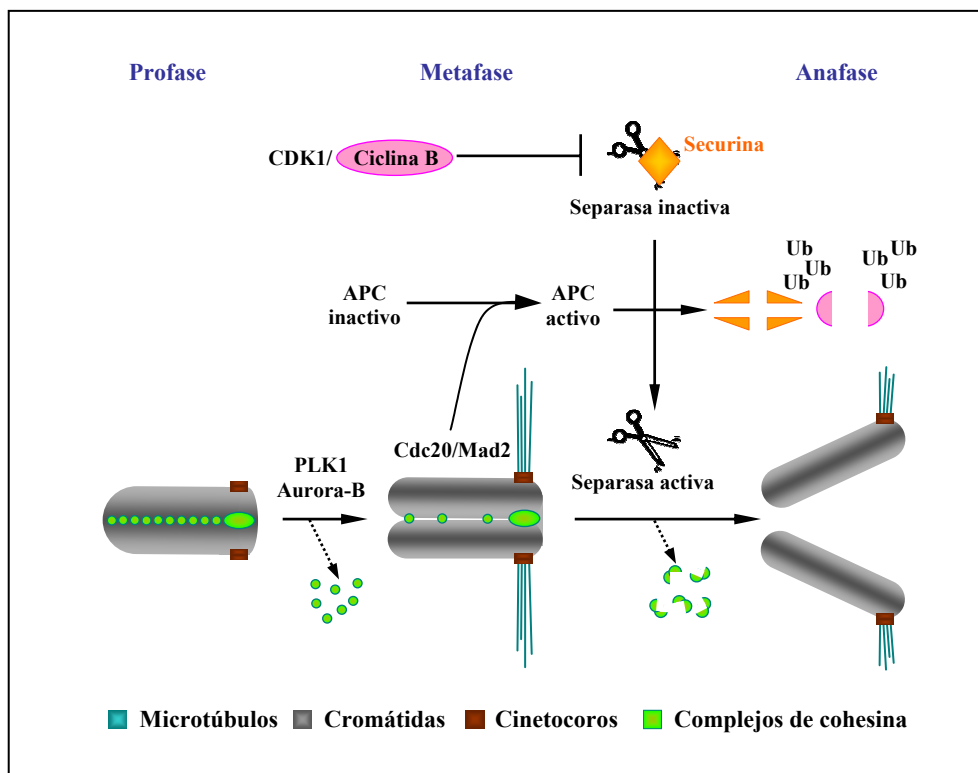
conjuntamente con Mad2 (Nasmyth, 2005). Mad2 es una proteína implicada en el mecanismo regulador de la entrada en anafase, comúnmente denominado SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), que se detecta únicamente en los cinetocoros que aún no se han unido a MTs (Li y Nicklas, 1997), de modo que parece estar regulando, junto con otras, la transición a anafase (Gorbsky y col., 1998; Yu y col., 1999).

Aunque la mayoría de los estudios se centran en el papel del complejo Cdc20/Mad2 como regulador de la entrada a anafase, existen otras proteínas que también han sido relacionadas con este proceso. Se ha descrito en vertebrados que la proteína quinasa BubR1, la cual necesita a Bub1 para localizarse en los cinetocoros en mitosis (Johnson y col., 2004), también puede intervenir en la regulación del SAC (Chan y col., 1999; Yao y col., 2000). Por otro lado, CENP-E es una proteína motora de la corona fibrosa y lámina externa del cinetocoro responsable en gran medida de los movimientos cromosómicos (Kim y col., 2008). Existen estudios que relacionan ambas proteínas y que han propuesto que BubR1 y CENP-E forman un complejo que podría funcionar como un mecanosensor de la tensión para desencadenar la transición a anafase (Chan y col., 1998).

En vertebrados el APC activo desencadena también la activación de la Separasa, pero a diferencia de lo que ocurre en levaduras, la Separasa está inhibida por dos vías diferentes. Una es la inactivación por su inhibidor, la Securina (Ciosk y col., 1998), y la otra es mediante el complejo CDK1/Ciclina B. Este complejo CDK1/Ciclina B inactiva a la Separasa por fosforilación, y en el momento en que el APC induce la destrucción de la Ciclina B por ubiquitinización cesa esa fosforilación y por tanto la Separasa se activa (Stemmann y col., 2001; Gorr y col., 2005; Huang y col., 2005; Huang y col., 2008). Los cinetocoros que no están unidos a MTs retrasan la liberación de la cohesión entre cromáticas hermanas secuestrando a Cdc20 en un complejo junto a Mad2, el cual promueve la activación del APC para la destrucción de la Securina y de la Ciclina B (Nasmyth, 2005) (Esquema 6).

Existen varios estudios funcionales sobre la actividad de la Separasa en la mitosis de vertebrados. En concreto, se ha demostrado en mamíferos que tanto la ausencia de Separasa como la generación de modelos mutantes en los que RAD21 es incapaz de ser fosforilada provoca graves defectos en la segregación cromosómica (Hauf y col., 2001; Kumada y col., 2006; Wirth y col., 2006).

Aunque todavía se desconocen los mecanismos moleculares que llevan a la degradación de la Separasa tras la anafase, se ha sugerido que existe una tercera vía de regulación de la Separasa de vertebrados que consiste en su propia autodegradación (Waizenegger y col., 2000; Zou y col., 2002).



**Esquema 6.** Dinámica de la liberación de la cohesión durante la transición metafase-anafase en la mitosis de vertebrados.

#### 2.1.4. Regulación de la cohesión centromérica en mitosis

Tanto en la mitosis de levaduras como en la de vertebrados la cohesión centromérica entre las cromátidas hermanas persiste hasta la transición metafase-anafase, momento en el cual la Separasa corta a la cohesina SCC1/RAD21 y se produce la apertura de los anillos de cohesina con la consecuente liberación de la cohesión. Por lo tanto, debe de existir un mecanismo que regule que esto no ocurra hasta ese momento evitando que se degrade prematuramente la cohesión centromérica durante la profase/prometáfase. Las proteínas que actualmente están tomando más relevancia como protectoras de la cohesión centromérica son las Shugoshinas.

La primera vez que se atribuyó a las Shugoshinas (Sgo) una función protectora de la cohesión centromérica fue en la meiosis de *S. pombe* y se la nombró de ésta manera porque Shugoshina significa en japonés “Espíritu guardián” (Kitajima y col., 2004). Curiosamente, mediante el alineamiento de sus secuencias genéticas se comprobó que MEI-S332 es la ortóloga de Sgo1 en *D. melanogaster* (Watanabe, 2005). Varios años antes ya se le había atribuido a MEI-S332 una función en la cohesión centromérica, aunque se demostraba que su papel no es indispensable ya que en esta especie la cohesión braquial parecía ser suficiente para mantener las cromátidas hermanas unidas hasta la anafase (LeBlanc y col., 1999).

Mediante diversas publicaciones en los últimos años se ha demostrado que el mecanismo de protección de la cohesión centromérica por parte de las Shugoshinas está bastante conservado en eucariotas (Watanabe y Kitajima, 2005). Las Shugoshinas ortólogas se han nombrado de diferentes maneras según las especies. Así, en la mitosis de *S. pombe* existen dos parálogas: Sgo1 y Sgo2 (Katis y col., 2004b; Marston y col., 2004), pero en cambio en *S. cerevisiae* sólo existe una variante, la Sgo1 (Marston y col., 2004; Rabitsch y col., 2004; Watanabe, 2005). En mamíferos también existen dos parálogas que en este caso se llaman SGOL1 y SGOL2 (Kitajima y col., 2004; Salic y col., 2004; McGuinness y col., 2005). Tanto en levaduras como en *D. melanogaster* y en vertebrados se ha demostrado que SGO1 es la responsable de proteger los complejos de cohesina centroméricos de la degradación por Separasa (Watanabe y Kitajima, 2005). Recientemente se ha demostrado también que SGOL2 también es esencial para la protección de la cohesión centromérica en la mitosis de mamíferos y que tiene una redistribución dependiente de tensión durante la prometafase (Lee y col., 2008).

Existen varios estudios que demuestran que Sgo1/SGOL1 forma un complejo con la fosfatasa PP2A para ejercer la protección de la cohesión sobre los centrómeros mitóticos y que este mecanismo está muy conservado tanto en levaduras como en vertebrados (Rivera y Losada, 2006). De este modo, parece ser que en *S. cerevisiae*, *S. pombe* y humanos (McGuinness y col., 2005; Kitajima y col., 2006; Riedel y col., 2006; Rivera y Losada, 2006; Tang y col., 2006) y SGOL1 recluta a PP2A a los centrómeros de manera que la fosfatasa promueve la defosforilación de SA2. De este modo, al revertirse la fosforilación de las cohesinas que había sido realizada por PLK1 durante la profase (Losada y col., 2002; Sumara y col., 2002; Uhlmann, 2003b; Hauf y col., 2005),



los complejos de cohesina centroméricos escapan a la vía de disociación parcial de la cohesión de los brazos cromosómicos durante la profase.

Aunque los mecanismos de regulación de las Shugoshinas requieren todavía un abordaje de estudio más profundo, se han propuesto fundamentalmente varias proteínas involucradas en la regulación de SGOL1: Bub1, Aurora-B, HP1 $\alpha$  y PLK1. En *S. pombe* Bub1 es imprescindible para la localización de las Shugoshinas puesto que se ha demostrado que con la interferencia postranscripcional de Bub1 mediante RNAi ni Sgo1 ni Sgo2 son capaces de reclutarse a los centrómeros (Tang y col., 2004; Kitajima y col., 2005; Vaur y col., 2005). Por otro lado, recientemente se ha sugerido que Bub1 está desempeñando una importante función en la regulación del SAC ya que en el modelo de ratón mutante condicional para Bub1, no solamente se inhabilita la unión de SGOL1 a los centrómeros, sino que además la Separasa se activa prematuramente y se produce una precoz segregación de las cromátidas hermanas (Perera y col., 2007). Por otro lado Aurora B regula la localización de Sgo1 ya que la inhibición de la quinasa provoca una redistribución de Sgo1 desde los centrómeros hacia los brazos cromosómicos tanto en *S. cerevisiae* (Kueng y col., 2006) como en humanos (Dai y col., 2006; Lipp y col., 2007; Pouwels y col., 2007). La proteína HP1 $\alpha$  (*Heterochromatin Protein 1 alpha*) también es necesaria para el reclutamiento de SGOL1 a los centrómeros en *S. pombe* (Yamagishi y col., 2008). Por último, se ha sugerido también que PLK1 regula la localización de la variante sSgo1 en células HeLa (Pouwels y col., 2007; Wang y col., 2008) y que a su vez SGOL1 es fosforilada por Aurora B y PLK1 de manera que existe una interdependencia de ambas proteínas en el reconocimiento de la tensión intercinetocórica durante el mecanismo regulador de la anafase (Pouwels y col., 2007). Lo que todavía no está claro es el mecanismo molecular por el cual Sgo se degrada o se deslocaliza de los centrómeros cuando deja de ejercer la protección sobre los mismos. No obstante, existen datos en vertebrados que apuntan a que SGOL1 es uno de los sustratos del APC y que por tanto podría degradarse por ubiquitinización una vez haya cumplido su función (Salic y col., 2004).

Recientemente se están aportando nuevos datos que implican a las Shugoshinas en otras funciones aparte de la meramente protectora de la cohesión centromérica. Así, se ha propuesto que la SGOL1 de vertebrados está también implicada en la asociación entre los centriolos, pues se ha visto que tras la depleción de SGOL1 mediante RNAi las parejas de centriolos de ambos polos celulares quedan separados (Wang y col., 2008).

Se ha demostrado también que SGOL2 es imprescindible para el reclutamiento de MCAK al dominio centromérico interno (Huang y col., 2007). MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin*), que es una KLP (*Kinesin-Like Protein*) despolimerizadora de MTs, se localiza en mitosis en los centrómeros de los cromosomas de mamíferos desde la profase tardía hasta la telofase (Wordeman y Mitchison, 1995) y se redistribuye en el centrómero dependiendo de tensión durante la prometafase (Andrews y col., 2004).

Aunque la mayoría de los estudios sobre la protección de la cohesión centromérica en mitosis se han centrado en la dinámica de las Shugoshinas, es importante al menos mencionar otras proteínas a las que recientemente se está involucrando en este fenómeno. Tal es el caso de Haspina (*Histone H3-Thr 3 kinase*), la cual es una proteína que sólo ha sido detectada en células humanas y de la que se ha sugerido que no es necesaria para el reclutamiento de SGOL1 a los centrómeros, pero que sin embargo sí lo es para la persistencia de la cohesión centromérica hasta la anafase (Dai y Higgins, 2005; Dai y col., 2006; Wang y col., 2008). Además, se ha demostrado también que la sobreexpresión de Haspina previene la liberación de la cohesión braquial (Dai y col., 2006). Por último, existen también algunos datos que proponen que otra proteína llamada PHB2 protege también la cohesión centromérica en la mitosis de células HeLa. En este trabajo se demuestra que el silenciamiento postranscripcional de PHB2 mediante RNAi provoca la separación prematura de las cromátidas hermanas independientemente de la localización de SGOL1 (Takata y col., 2007).

#### **2.1.5. Cofactores del complejo de cohesina mitótico**

Existen otras proteínas implicadas en la cohesión entre cromátidas hermanas que si bien no se consideran componentes del complejo de cohesina interaccionan con él y modulan su dinámica de unión y disociación de los cromosomas. A estas proteínas se las denomina como cofactores del complejo de cohesina y se conocen fundamentalmente tres: PDS5, WAPL y Sororina (Esquema 3). Estos tres cofactores coinmunoprecipitan con las cohesinas en extractos de células HeLa y su asociación a la cromatina depende de la presencia del complejo de cohesina (Sumara y col., 2000; Losada y Hirano, 2005; Rankin, 2005; Gandhi y col., 2006; Kueng y col., 2006).

PDS5 es una proteína con numerosas repeticiones del dominio HEAT que está evolutivamente conservada en hongos (van Heemst y col., 1999; Zhang y col 2005), *S.*

*cerevisiae* (Hartman y col., 2000; Panizza y col., 2000), *S. pombe* (Tanaka y col., 2001), *C. elegans* (Wang y col., 2003), *D. melanogaster* (Dorsett y col., 2005) y vertebrados (Losada y Hirano, 2005). Se ha propuesto en *S. pombe* que esta proteína está involucrada en el establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas durante la fase S de la interfase, y que esta función está a su vez regulada por Eso1 (ortóloga de Escol1) (Tanaka y col., 2001; Noble y col., 2006). Sin embargo, existen otros trabajos que sugieren que Pds5 en *S. cerevisiae* es necesaria para el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas pero no para el establecimiento, y que este proceso está regulado por sumoilación (Panizza y col., 2000; Stead y col., 2003). En vertebrados se han identificado dos proteínas parálogas: PDS5A y PDS5B (Losada y col., 2005), que pueden interactuar tanto con la cohesina SA1 como con SA2 (Sumara y col., 2000; Losada y Hirano, 2005). En vertebrados sí existen datos que apuntan a que PDS5 no sólo interviene en el establecimiento de la cohesión sino también en su mantenimiento puesto que el silenciamiento de la expresión génica de PDS5 mediante RNAi en células HeLa provoca defectos menores en la cohesión entre cromátidas hermanas y en extractos de ovocitos *X. laevis* altera la cohesión centromérica (Losada y Hirano, 2005). Sin embargo, mediante la generación del modelo de ratón mutante para *pds5b*, otros autores defienden que la ausencia de PDS5B no altera la cohesión entre cromátidas hermanas, pero que provoca un síndrome equiparable a la patología humana conocida como síndrome de Cornelia de Lange (Zhang y col., 2007). Además, recientemente se ha involucrado a PDS5 en la liberación de cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase en *X. laevis* (Shintomi y Hirano, 2009). Como puede comprobarse en la literatura existen varias controversias con respecto a la dinámica funcional de PDS5 en las diferentes especies, por lo que serán necesarios más estudios que clarifiquen sus mecanismos de actuación. Además, no existen hasta la fecha estudios de su localización.

La proteína WAPL fue descubierta en *D. melanogaster* y es el producto del gen *Drosophila wings apart-like* que está implicado en la organización de la heterocromatina (Verni y col., 2000). Esta proteína es necesaria para el correcto desensamblaje de la cohesión entre cromátidas hermanas a nivel braquial durante la profase mitótica mediante interacción directa con las cohesinas RAD21 y SA1/2 en humanos (Zhang y col., 2005; Gandhi y col., 2006; Kueng y col., 2006). Y en *X. laevis* (Shintomi y Hirano, 2009). Se ha sugerido recientemente que las proteínas ortólogas de

WAPL en *S. cerevisiae* (Ben-Shahar y col., 2008) y *S. pombe* (Bernard y col., 2008) también están de algún modo involucradas en la liberación de los complejos de cohesina de la cromatina. Recientemente se ha demostrado que WAPL interacciona con SA1, RAD21 y PDS5 en vertebrados (Shintomi y Hirano, 2009), pero tampoco se conoce hasta la fecha ningún estudio citológico de su localización.

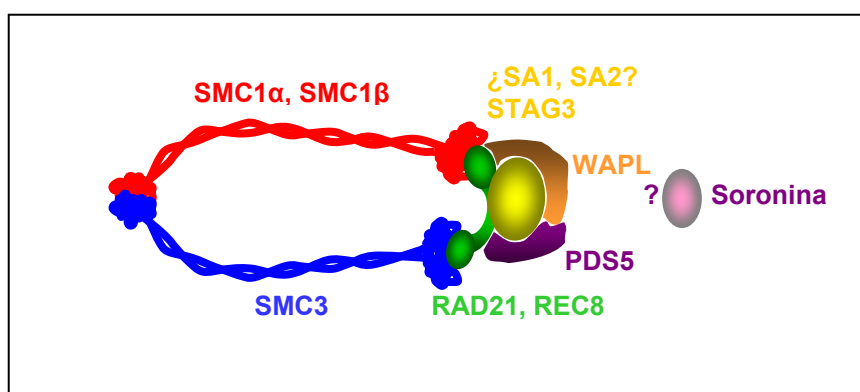
La Sororina es una proteína que interacciona con el complejo de cohesina en extractos nucleares de células de vertebrados, pero que hasta la fecha no se ha identificado en otros organismos. Esta proteína se localiza dispersa en el núcleo durante la interfase y sus niveles de expresión están regulados por el complejo APC (Rankin, 2005), y también se la ha implicado en el establecimiento de la cohesión. El silenciamiento génico de la expresión de Sororina mediante RNAi no provoca fallos en la cohesión entre cromátidas hermanas hasta la metafase, sin embargo, se desencadena un bloqueo tras la metafase en el que las cromátidas hermanas quedan separadas (Díaz-Martínez y col., 2007). Además, la ausencia temporal de Soronina mediante la técnica FRAP en células HeLa provoca fallos en la cohesión entre cromátidas hermanas ya desde la interfase, ya que aunque no se ve afectada la carga, la cantidad de complejos de cohesina estables que se unen a la cromatina es mucho menor (Schmitz y col., 2007).

## 2.2. Meiosis

### 2.2.1. Los complejos de cohesina meióticos

Existen varias cohesinas específicas de meiosis que conformarían los complejos de cohesina meióticos (Esquema 7). En mamíferos, las parálogas meióticas de SMC1 $\alpha$ , RAD21 y SA1/2 son SMC1 $\beta$  (Revenkova y col., 2001), REC8 (Parisi y col., 1999; Watanabe y Nurse, 1999) y STAG3 (Pezzi y col., 2000; Prieto y col., 2001), respectivamente (Tabla 1). Aunque estas variantes son específicamente meióticas, coexisten también en algunos casos con las parálogas mitóticas. Así es el caso de SMC1 $\alpha$  y SMC1 $\beta$ , que si bien coexisten, no lo hacen a lo largo de toda la meiosis puesto que SMC1 $\alpha$  sólo se detecta hasta diplotena (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Revenkova y col., 2004). También se ha demostrado que las parálogas REC8 y RAD21 coexisten en la meiosis de ratón (Prieto y col., 2001; Parra y col., 2004; Xu y col., 2004).

En los últimos años, ha ido tomando cada vez más fuerza la idea de que existen diferentes combinaciones de subunidades que dan lugar a múltiples complejos de cohesina (Revenkova y Jessberger, 2006). Diferentes ensayos moleculares han demostrado la existencia de múltiples complejos de cohesina tanto en *S. pombe* (Kitajima y col., 2003b) como en ovocitos de mamíferos (Revenkova y Jessberger, 2005), pero hasta el momento no se conoce si estos múltiples complejos aparecen durante la meiosis de machos de ratón, su distribución cromosómica precisa y su dinámica.



**Esquema 7.** Estructura de los complejos de cohesina meióticos de mamíferos.

### 2.2.2. Dinámica de los complejos de cohesina en meiosis

La dinámica de aparición y pérdida de las cohesinas en meiosis es muy diferente a lo que ocurre en mitosis.

Durante la profase-I, las cohesinas se localizan subyaciendo a los EAs y ELs del CS a lo largo del eje de cohesinas (Yuan y col., 2000; Valdeolmillos y col., 2007). Cronológicamente, las primeras cohesinas que se describieron en los EAs/ELs del CS en espermátocitos de mamíferos fueron SMC1α y SMC3 (Eijpe y col., 2000). Posteriormente se describió que el caso de SMC1α es especial ya que sólo es detectable hasta diplotena, y a la vez se identificó a su paróloga específica de meiosis, la SMC1β (Revenkova y col., 2001). Aquellos trabajos sugerían que SMC3 y SMC1β se localizan en los EAs/ELs del CS y se acumulan en los centrómeros durante la diacinesis. Más tarde se describió que STAG3 se localiza también en los EAs/ELs del CS durante la profase-I y en el dominio intercromatídico de los bivalentes en metafase-I (Suja y col., 1999) así como en los centrómeros desde la diacinesis hasta la metafase-I (Prieto y col.,

2001). Un año más tarde se demostró que RAD21 también es detectada en meiosis (Prieto y col., 2002) y posteriormente se describió que REC8, la paróloga específicamente meiótica de RAD21, se localiza en los EAs/ELs del CS durante la profase-I y en los centrómeros y el dominio intercromatídico de los cromosomas hasta la metafase-I (Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003). En último lugar, se corroboró que RAD21 aparece en los EAs/ELs del CS durante la profase-I y en los centrómeros y el dominio intercromatídico en cromosomas condensados en metafase-I (Parra y col., 2004; Xu y col., 2004).

En cromosomas condensados las cohesinas se localizan en el dominio intercromatídico entre los brazos de las cromátidas hermanas y/o en la región pericentromérica en metafase-I. La fracción de cohesina entre brazos se libera en la transición metafase-I/anafase-I y supuestamente persistiría únicamente en el centrómero hasta la metafase-II (Esquema 8). Sin embargo, existe mucha controversia sobre la localización precisa de las cohesinas en cromosomas condensados y la persistencia o no de dichas proteínas hasta la metafase-II. Como hemos comentado, SMC1 $\beta$ , RAD21 y REC8 se han detectado en el dominio intercromatídico y en los centrómeros de los cromosomas hasta la metafase-II en esparcidos de ovocitos y espermatoцитos (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Xu y col., 2004; Kudo y col., 2006), y SMC3 únicamente en los centrómeros (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003). Sin embargo, existen también otros autores que defienden la ausencia de cohesinas en los cromosomas en metafase-II, ya que se ha publicado que REC8 no es detectable en los cromosomas en metafase-II de maíz (Hamant y col., 2005), ni en espermatoцитos de ratón (Parra y col., 2004) ni *S. cerevisiae* (Kateneva y col., 2005), ni tampoco la ortóloga SCC1 en *A. thaliana* (Cai y col., 2003; Chelysheva y col., 2005).

#### **2.2.2.1. Disociación parcial de cohesinas en profase-I**

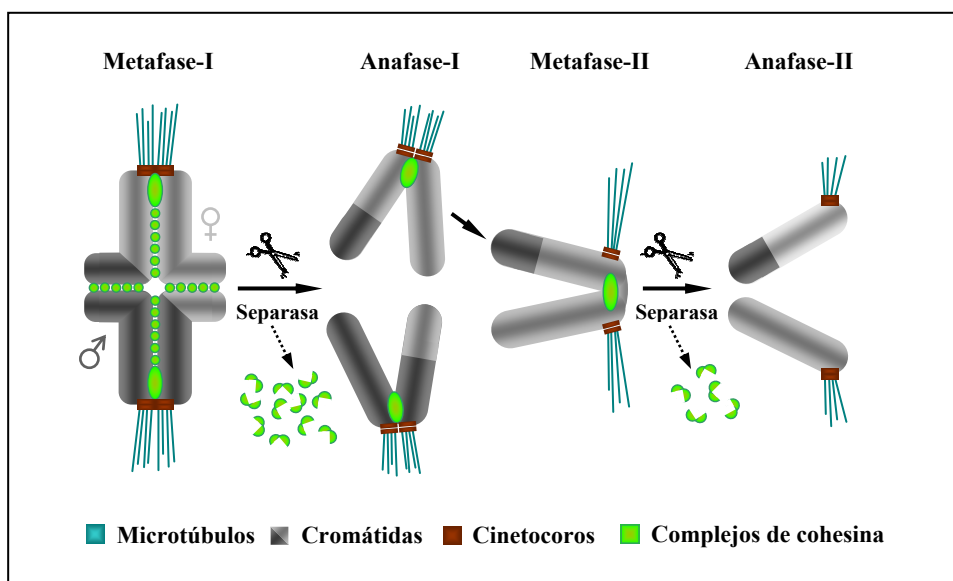
En la meiosis de mamíferos, al igual que las proteínas del CS SYCP3 y SYCP2 (Parra y col., 2004), las cohesinas RAD21 (Parra y col., 2004), STAG3 (Prieto y col., 2001), SMC1 $\beta$  (Revenkova y col., 2001), SMC3 (Eijpe y col., 2003) y REC8 (Eijpe y col., 2003), se van eliminando parcialmente de los ELs desinapsados durante la diacinesis. También se ha demostrado que durante la profase-I de *S. cerevisiae* existe una pérdida parcial de complejos de cohesina mediada por la fosforilación de Rec8

(Kateneva y col., 2005). Sin embargo, este proceso no está claro todavía ni existen evidencias citológicas suficientes que lo demuestren.

#### **2.2.2.2. Liberación diferencial de la cohesión entre cromátidas hermanas en meiosis**

En este punto es importante insistir en que hay que distinguir claramente entre la segregación en mitosis y en meiosis. Durante la mitosis han de resolverse al unísono la cohesión entre brazos y a nivel de centrómero, mientras que en meiosis ha de producirse una liberación secuencial de la cohesión braquial y centromérica respectivamente. En primer lugar se libera la cohesión entre brazos en la transición metafase-I/anafase-I, y en segundo lugar la cohesión centromérica ha de permanecer intacta hasta la metafase-II y liberarse exclusivamente en la transición metafase-II/anafase-II para el correcto reparto del material genético (Esquema 8).

En la meiosis de levaduras los complejos de cohesina localizados en los brazos se degradan proteolíticamente por acción de la Separasa, la cual corta a la cohesina Rec8 en la transición metafase-I/anafase-I con la consecuente apertura de los anillos de cohesina para permitir la segregación reduccional de los cromosomas homólogos a polos opuestos de la célula (Buonomo y col., 2000; Haering y Nasmyth, 2003; Kitajima y col., 2003a). Recientemente se ha demostrado que en mamíferos la liberación de la cohesión braquial en la transición metafase-I/anafase-I se debe también a la acción proteolítica de la Separasa sobre REC8. En ovocitos de ratón se ha demostrado que tras la inactivación de la Separasa se desencadena un bloqueo de la meiosis en metafase-I por la imposibilidad de liberar los complejos de cohesina braquiales para segregar cromosomas homólogos a polos opuestos (Kudo y col., 2006) y muy recientemente se ha demostrado en machos de ratón que la expresión de una variante de REC8 llamada REC8-N, la cual no puede ser degradada proteolíticamente por la Separasa, provoca esterilidad por la acumulación de células con carga de DNA 4C (Kudo y col., 2009). La cohesión centromérica persiste mantenida por los complejos de cohesina localizados en las regiones centroméricas hasta la transición metafase-II/anafase-II, durante la cual los complejos de cohesina centroméricos se abren también por la acción de la Separasa para permitir la segregación ecuacional de las cromátidas hermanas a polos opuestos (Haering y Nasmyth, 2003).



**Esquema 8.** Dinámica de la liberación de la cohesión durante la meiosis de mamíferos.

### 2.2.3. Regulación de la cohesión centromérica en meiosis

Debido a que en la meiosis la liberación de la cohesión entre cromátidas hermanas ha de ser imperativamente secuencial para conseguir el correcto reparto de cromosomas homólogos en la anafase-I (liberación de la cohesión braquial) y de cromátidas en la anafase-II (liberación de la cohesión centromérica), ha de existir un mecanismo regulador que proteja a los complejos de cohesina centroméricos de su degradación durante la meiosis-I.

La cohesina REC8 se detecta en los centrómeros de los cromosomas en metafase-II en *S. cerevisiae* (Klein y col., 1999), *S. pombe* (Watanabe y Nurse, 1999), *C. elegans* (Pasierbek y col., 2001) y ovocitos de ratón (Lee y col., 2006; Lee y col., 2008; Liu y Keefe, 2008). Teniendo en cuenta que tanto en levaduras como en mamíferos la Separasa corta proteolíticamente a REC8 de los complejos de cohesina localizados en los brazos cromosómicos (Buonomo y col., 2000; Haering y Nasmyth, 2003; Kitajima y col., 2003a), el hecho de encontrar REC8 en los centrómeros de los cromosomas en metafase-II sugiere que la REC8 de los complejos de cohesina centroméricos son de alguna manera refractarias a la actividad de la Separasa al comienzo de la anafase-I.

Hace ya casi una década se atribuyó a la proteína específica de meiosis Spo13 una función protectora de la cohesión centromérica en *S. cerevisiae* (Klein y col., 1999; Lee y col., 2002; Shonn y col., 2002). No obstante, se ha demostrado que su papel no es



imprescindible ya que en mutantes para Spo13 persiste cierta cantidad de Rec8 en los centrómeros de los cromosomas en metafase-II (Klein y col., 1999). También se propuso en *D. melanogaster* que la proteína específica de centrómero MEI-S332 era necesaria para mantener la cohesión entre cromátidas hermanas en meiosis (Kerrebrock y col., 1995; Tang y col., 1998; Clarke y col., 2005). Por otro lado, la proteína de *D. melanogaster* ORD es también necesaria para mantener la cohesión en meiosis, actuando previamente a que lo haga MEI-S332 (Mason, 1976; Miyazaki y Orr-Weaver, 1994; Bickel y col., 1998).

En los últimos años, al igual que en mitosis, las proteínas más relevantes implicadas en la protección de los complejos de cohesina centroméricos frente a la Separasa durante la meiosis-I son las Shugoshinas. La primera Shugoshina que se describió fue la Sgo1 en la meiosis de *S. pombe* (Kitajima y col., 2004), descubriéndose más tarde que existe otra paróloga llamada Sgo2 (Rabitsch y col., 2004). Por el contrario, *S. cerevisiae* tiene sólo Sgo1 (Marston y col., 2004). Curiosamente, se comprobó entonces que MEI-S332 es la ortóloga de Sgo1 en *D. melanogaster* (Marston y col., 2004; Rabitsch y col., 2004). En la meiosis de mamíferos existen dos parálogas: SGOL1 y SGOL2, también conocida como Tripina (Kitajima y col., 2004; Kitajima y col., 2005). Se ha identificado también a la paróloga ZmSgo1 en la meiosis de maíz (Hamant y col., 2005).

Se ha demostrado que en meiosis las Shugoshinas son las responsables de la protección de la cohesión centromérica durante la primera división meiótica (Lee y Orr-Weaver, 2001; Watanabe, 2005). De este modo, en *S. pombe* Sgo1 es necesaria únicamente para la meiosis y su ausencia provoca graves fallos en la segregación cromosómica durante la meiosis-II, mientras que Sgo2 es reguladora de la cohesión centromérica tanto en mitosis como en meiosis (Katis y col., 2004b; Kitajima y col., 2004; Rabitsch y col., 2004; Vaur y col., 2005; Vanoosthuyse y col., 2007). En *S. cerevisiae* Sgo1 también es la responsable de la protección de la cohesión centromérica durante la meiosis-I (Kitajima y col., 2003b; Katis y col., 2004a; Marston y col., 2004). Sin embargo, los estudios en mamíferos son muy escasos, aunque recientemente se ha reportado en ovocitos de ratón que SGOL2 es la responsable de proteger a REC8 de la degradación por parte de la Separasa en los centrómeros durante la meiosis-I (Lee y col., 2008).

Por otro lado se ha demostrado también que en la meiosis de levaduras y de vertebrados las Shugoshinas actúan en colaboración con la fosfatasa PP2A (Kitajima y col., 2006; Riedel y col., 2006). PP2A defosforila a los complejos de cohesina centroméricos revirtiendo la actividad de la quinasa PLK1 y permitiendo así que escapen de la proteólisis por Separasa durante la meiosis-I.

Los estudios sobre la regulación de las Shugoshinas durante la meiosis son muy escasos. Los únicos datos que se conocen hasta el momento es que en la meiosis de *S. pombe* la localización de Sgo1 está regulada por Bub1 (Kitajima y col., 2005; Vaur y col., 2005), e INCENP y Aurora B reclutan a la ortóloga MEI-S332 en *D. melanogaster* (Resnick y col., 2006).

Recientemente se están aportando nuevos datos al escenario científico que implican a las Shugoshinas en otras funciones que las meramente protectoras de la cohesión. En esta dirección se han publicado resultados en ovocitos de ratón en los que implican a SGOL2 en colaboración de PP2A como sensora de tensión en metafase-II (Lee y col., 2008).

Ya que la mayoría de los estudios sobre las Shugoshinas se han desarrollado en el campo de la biología molecular, existen muy escasos datos de su localización durante la meiosis. En *S. pombe* Sgo1 se localiza en la región centromérica (Kitajima y col., 2004), al igual que ZmSgo1 en maíz (Hamant y col., 2005) y recientemente se ha descrito que SGOL2 se localiza también en los centrómeros de ovocitos de ratón (Lee y col., 2008). Sin embargo, no existen estudios de la localización de las Shugoshinas durante la espermatogénesis de mamíferos.

#### **2.2.4. Cofactores de los complejos de cohesina meióticos**

Los cofactores del complejo de cohesina son proteínas que no se consideran componentes del complejo de cohesina pero que interaccionan con él y modulan su dinámica de unión y disociación de los cromosomas. Como hemos comentado en el apartado de mitosis se conocen fundamentalmente tres: PDS5, WAPL y Sororina, pero existen escasos datos sobre su dinámica y localización durante la meiosis. Hasta el momento, no se conoce ningún dato sobre la localización ni de Sororina ni de PDS5 durante la meiosis de mamíferos, aunque se conoce que esta última desempeña un importante papel en la cohesión entre cromátidas hermanas en la meiosis de *X. laevis* (Losada y col., 2005). WAPL se ha detectado a lo largo de los EAs/ELs del CS durante

la profase-I en espermatoцитos (Kuroda y col., 2005) y ovocitos (Zhang y col., 2008a) de ratón.

### 2.3. Otras funciones del complejo de cohesina

En los últimos tiempos son cada vez más las posibles funciones en que se está implicando a las subunidades de cohesina que difieren de la intrínseca cohesión entre cromátidas tanto en mitosis como en meiosis (Peters y col., 2008; Barbero, 2009).

En mitosis, uno de los fenómenos que se han estado relacionando en los últimos años con la cohesión es la condensación cromosómica. Por ejemplo en *S. cerevisiae*, tras la mutación de las proteínas implicadas en la cohesión, no es únicamente ésta la que se ve alterada, sino también la condensación cromosómica (Castano y col., 1996), e incluso se ha afirmado que el establecimiento previo de la cohesión es necesario para la futura condensación (Lavoie y col., 2002). No obstante, otros autores refutan que la pérdida de cohesión no afecta a la condensación en eucariotas superiores (Losada y col., 1998; Sonoda y col., 2001; Vass y col., 2003).

Por otro lado, también se está involucrando a las cohesinas en multitud de funciones diversas durante la meiosis. Algunas de ellas son funciones relativamente relacionadas como por ejemplo la monoorientación de cinetocoros hermanos en metafase-I (Watanabe y Nurse, 1999; Lee y col., 2003; Yokobayashi y col., 2003; Parra y col., 2004; Watanabe, 2004; Kudo y col., 2006), el ensamblaje del eje cromosómico (Revenkova y Jessberger, 2006) y la sinapsis (Eijpe y col., 2000). Pero también se han propuesto otras menos esperadas como la regulación de recombinación (Peltari y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Revenkova y col., 2004), la formación de quiasmas (Bannister y col., 2004) e incluso la reparación de roturas de DNA (van Heemst y Heyting, 2000; Firooznia y col., 2005; Watrin y Peters, 2006). Se ha propuesto que en los lugares en los que se producen roturas en el DNA se produce una acumulación *de novo* de cohesinas para favorecer el acercamiento entre las hebras rotas para su futura reparación tanto en vertebrados (Potts y col., 2006) como en levaduras (Strom y col., 2004; Unal y col., 2004; Lindroos y col., 2006). Recientemente, se han generado mutantes de REC8 en levaduras con los que se demuestra que esta subunidad está implicada en el apareamiento y la sinapsis, además de la recombinación y obviamente la cohesión entre cromátidas hermanas. Estos estudios se basan en que las diferentes fosforilaciones que sufre REC8 en uno o varios de los 29 sitios accesibles que posee

(Brar y col., 2006) dan lugar a modificaciones de REC8 específicas que actúan en unos procesos o en otros en las diferentes etapas de la primera división meiótica (Brar y col., 2009).

Además, existen también datos que relacionan a las cohesinas con enfermedades humanas que recientemente están comenzando a denominarse “cohesinopatías”. Fundamentalmente existen dos errores graves en la cohesión relacionados con estas patologías: la aparición de univalentes o pérdida precoz de la cohesión centromérica, o la no-disyunción cromosómica. Se ha demostrado en humanos (Angell, 1995; Pellestor y col., 2003) y en ratones mutantes para la cohesina SMC1 $\beta$  (Hodges y col., 2005), que la frecuencia de errores de no-disyunción aumenta con la edad materna. El caso más conocido es el Síndrome de Down o trisomía del cromosoma 21 que se produce, en la mayoría de los casos, por una no-disyunción del cromosoma 21 durante la meiosis-I en el ovocito y cuya frecuencia de aparición aumenta en relación a la edad materna (Hassold y Hunt, 2001; Gilliland y Hawley, 2005). Más recientemente se han descrito además otras dos cohesinopatías: el Síndrome de Cornelia de Lange y el Síndrome de Roberts/SC.

El Síndrome de Cornelia de Lange (Dorsett y Krantz, 2009) se ha relacionado con mutaciones en las cohesinas SMC1 $\alpha$  y SMC3 (Musio y col., 2006; Deardorff y col., 2007; Mannini y col., 2009) o también en la adherina Scc2, que está implicada en la carga de los complejos de cohesina a la cromatina (Tonkin y col., 2004). Curiosamente un síndrome parecido se ha observado en ratones en los que existen severos fallos en la alineación cromosómica (Liu y Keefe, 2008) y en ratones mutantes para el cofactor del complejo de cohesina PDS5B (Zhang y col., 2007). Por otro lado, el Síndrome de Roberts (RBS/SC) (Dorsett, 2007) se atribuye a mutaciones en Esco2, una enzima relacionada con el establecimiento de la cohesión (Tomkins y col., 1979; Vega y col., 2005). Estos dos síndromes se caracterizan por diversas alteraciones del crecimiento y desarrollo y por un severo retraso mental. Nuevas pistas que podrían explicar el retraso mental en estos pacientes son los datos que demuestran que la correcta regulación de la cohesión entre las cromátidas hermanas determina en parte la morfogénesis neuronal en *Drosophila* (Pauli y col., 2008; Schuldiner y col., 2008). Todas las investigaciones citológicas que se realicen con respecto a la localización y función del complejo de cohesina, así como la generación de modelos animales para los diferentes factores y proteínas relacionadas con el fenómeno de cohesión podrían ser muy útiles para

entender la aparición y características de éstos síndromes. Además, los estudios genéticos de caracterización de los genes responsables de las proteínas implicadas en la formación y regulación de complejo de cohesina pueden ayudar a esclarecer los fundamentos teóricos que expliquen las cohesinopatías, e incluso podrían ser utilizados en terapias de selección embrionaria preimplantacional en familias con antecedentes en este tipo de patologías.

### **3. La cohesión entre cromátidas hermanas mediada por concatenaciones de DNA**

#### **3.1. Concatenación/Decatenación de moléculas de DNA**

En el momento de la replicación, se produce la formación de dos cromátidas hermanas, cada una de las cuales está formada por una molécula de doble hélice de DNA. Las cromátidas hermanas permanecen unidas por concatenaciones de DNA tras la replicación (Murray y Szostak, 1985), pero se desconoce exactamente de qué modo y en qué momento se entrelazan las horquillas de replicación del DNA que darían lugar a las uniones que persisten uniendo cromátidas hermanas hasta la anafase. Basándose en datos obtenidos en el virus SV40, se sugirió que el entrelazado de las moléculas de DNA hermanas producido por la colisión de horquillas de replicación convergentes (Sundin y Varshavsky, 1980) podría ser responsable de mantener unidas a las cromátidas hermanas hasta la transición metafase/anafase (Murray y Szostak, 1985). Según este modelo, estas concatenaciones o encadenamientos entre moléculas de DNA hermanas serían resueltas por la DNA Topoisomerasa II $\alpha$ .

Está claro que estas concatenaciones de DNA exclusivamente no son suficientes para mantener cohesionadas las cromátidas, pero la segregación completa de las cromátidas en la anafase no ocurre hasta que estas uniones se vean resueltas topológicamente por las Topoisomerasas (Porter y Farr, 2004; Nitiss, 2009a).

#### **3.2. La DNA Topoisomerasa II $\alpha$**

Las DNA Topoisomerasas son una familia de proteínas que desempeñan funciones enzimáticas y estructurales.

Las DNA Topoisomerasas son enzimas isomerasas que actúan sobre la topología del DNA (Champoux, 2001). Dos rasgos distintivos caracterizan a estas enzimas. En

primer lugar, las Topoisomerasas pueden cortar y empalmar repetidamente los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos constituyentes de las cadenas de DNA, y en segundo lugar, permiten que otras cadenas de DNA pasen entre los dos cabos momentáneamente escindidos (Nitiss, 2009a). La comparación de las propiedades catalíticas y de la secuencia de aminoácidos lleva a una clasificación de las Topoisomerasas en tres tipos o grupos evolutivos distintos: Topoisomerasas de tipo IA, Topoisomerasas de tipo IB y Topoisomerasas de tipo II (Champoux, 2001). En concreto, la DNA Topoisomerasa II (Topo II) es una enzima homodimérica que resuelve los problemas topológicos ocasionados por los superenrollamientos de las cadenas de DNA cortando y empalmado ambas cadenas de la doble hélice de DNA simultáneamente y cruzando posteriormente, a través de dicho corte, a otra doble hélice de DNA. Existen dos isoformas de la Topo II en mamíferos (Sakaguchi y Kikuchi, 2004): Topo II $\alpha$  (dímero de una proteína de 170 kDa) que es esencial en mitosis (Akimitsu y col., 2003), y Topo II $\beta$  (dímero de una proteína de 189 kDa) que es dispensable ya que los ratones que no expresan dicha proteína son viables (Grue y col., 1998).

Por otro lado, Topo II desempeña una importante función sobre la estructura cromosómica. Topo II es uno de los componentes estructurales del *scaffold* (eje cromatídico) tanto en cromosomas mitóticos como meióticos (Earnshaw y col., 1985; Earnshaw y Heck, 1985; Moens y Earnshaw, 1989), y además juega un papel importante en la condensación cromosómica en colaboración con las condensinas (Coelho y col., 2003; Maeshima y Laemmli, 2003; Hirano, 2005). Topo II también está implicada en la regulación de la estructura del cinetocoro (Rattner y col., 1996; Christensen y col., 2002) y en la cohesión centromérica (Bachant y col., 2002; Porter y Farr, 2004). Además, Topo II se perfila como una de las principales responsables de la segregación de cromátidas hermanas en mitosis (Holloway, 1995; Warburton y Earnshaw, 1997) y células de mamíferos *in vitro* (Downes y col., 1991; Clarke y col., 1993), y en meiosis tanto en *S. cerevisiae* (DiNardo y col., 1984; Koshland y Hartwell, 1987), *S. pombe* (Holm y col., 1985; Uemura y col., 1987), *X. laevis* (Shamu y Murray, 1992) y ratón (Cobb y col., 1997).

Si bien se han realizado varios estudios sobre la localización y dinámica de Topo II, todavía existen controversias y dudas sobre su distribución tanto en mitosis como en meiosis. En mitosis, Topo II se acumula en los centrómeros de los cromosomas y

persiste hasta anafase en diferentes especies de mamíferos (Taagepera y col., 1993; Rattner y col., 1996; Sumner, 1996; Null y col., 2002; Tavormina y col., 2002), y se localiza a lo largo de los ejes cromatídicos en *D. melanogaster* (Steffensen y col., 2001; Coelho y col., 2003). Por el contrario, Topo II marca toda la cromatina en cromosomas de *X. laevis* y no se restringe a los ejes cromatídicos (Hirano y Mitchison, 1994). En meiosis Topo II se ha localizado en los centrómeros durante la profase-I de ratón (Cobb y col., 1999b) y a lo largo de los ELs en espermatoцитos de gallo (Moens y Earnshaw, 1989) y *Bombyx mori* (Moens, 1990). Además Suja y col. (1999), utilizando anticuerpos contra MPM-2, que detecta entre otras proteínas fosforiladas a Topo II (Taagepera y col., 1993), detectaron que ésta se localiza a lo largo del CS en profase-I y en el centrómero y en el dominio intercromatídico de bivalentes en metafase-I de ortópteros.

### 3.3. Regulación de la función de Topo II

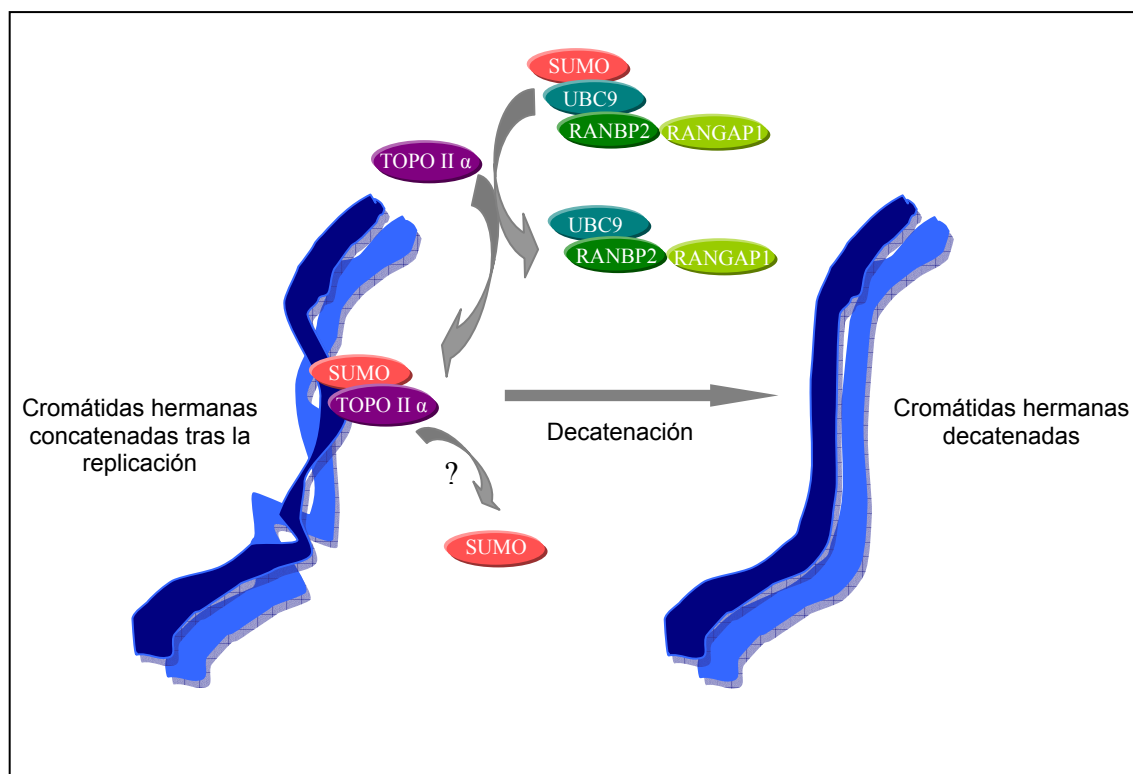
En mitosis se han descrito dos vías de regulación de Topo II como decatenadora de moléculas de DNA: mediante fosforilación y mediante sumoilación.

En primer lugar, se ha sugerido recientemente que la quinasa PLK1 fosforila a Topo II durante la interfase y la metafase en células HeLa y que esta fosforilación es necesaria para la actividad decatenadora de Topo II tanto en la resolución de las concatenaciones de DNA durante la fase S de la interfase como en la transición metafase/anafase (Li y col., 2008).

En segundo lugar, se ha descrito en mitosis que la función de Topo II en anafase está regulada por sumoilación en *S. cerevisiae* (Bachant y col., 2002). La sumoilación es un procesamiento postranscripcional que sufren muchas proteínas y que consiste en la unión covalente de un péptido similar a la ubiquitina denominado SUMO (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) a determinados residuos de lisina de la proteína diana. En meiosis, la sumoilación está relacionada, entre otros procesos, con la formación del cuerpo XY, la inactivación de la cromatina, la nucleación de MTs, la regulación de la transcripción, replicación y reparación de DNA y la recombinación (Gill, 2004; Johnson, 2004; Rogers y col., 2004; Vigodner y Morris, 2005). Las SUMOs son proteínas de unos 100 aa que regulan postranscripcionalmente la función o localización de diferentes proteínas diana mediante un proceso llamado sumoilación (Gill, 2004; Johnson, 2004). Existen tres parálogas en organismos superiores: SUMO1, SUMO2 y SUMO3. Estas dos últimas suelen nombrarse conjuntamente como SUMO2/3 ya que

son homólogas en un 95% de sus secuencias. En levaduras, SUMO1 está relacionada con la formación del CS y se localiza en las regiones sinapsadas de los cromosomas (de Carvalho y Colaiacovo, 2006; Hooker y Roeder, 2006). En espermatoцитos de ratón, SUMO1 ha sido localizada en el cuerpo XY durante paquitena (Rogers y col., 2004; Vigodner y Morris, 2005) y además en los cromocentros en diplotena (La Salle y col., 2008). SUMO2/3 se localiza en el cuerpo XY, en los cromocentros hasta diplotena y en los centrómeros en metafase-I (La Salle y col., 2008). En humanos, se ha visto en los EAs del par XY traslocándose a los centrómeros hacia el final de la profase-I (Vigodner y Morris, 2005).

El proceso enzimático por el cual las proteínas SUMO se unen al sustrato consiste en tres pasos (Dawlaty y col., 2008) (Esquema 9): primero, SUMO (SUMO1 y/o SUMO2/3) es activada por el complejo SAE1/SAE2 (*SUMO E1 activating complex*). La SUMO activada es más tarde transferida a UBE2I (también conocida como UBC9 o *SUMO E2 conjugating enzyme*). Por último, una SUMO E3 ligasa promueve la transferencia de SUMO desde UBE2I hasta el sustrato. UBE2I se localiza en los CSs durante la paquitena y diplotena y en el centrómero en metafase-I en espermatoцитos de ratón (La Salle y col., 2008). Hay muchas proteínas que tienen actividad SUMO E3 ligasa como por ejemplo PIAS $\gamma$  y RanBP2.



**Esquema 9.** Regulación de la Topo II en la decatenación de las cromátidas hermanas en mitosis. Esquema modificado del original en Dawlaty y col. (2008).



PIAS $\gamma$  tiene actividad SUMO E3 ligasa y está relacionada con la necesaria sumoilación de Topo II y otras proteínas centroméricas en extractos de huevos de *X. laevis* para la correcta separación de cromátidas hermanas (Azuma y col., 2005). El silenciamiento postranscripcional de PIAS $\gamma$  por medio de RNAi bloquea la segregación de cromátidas hermanas ya que los cinetocoros hermanos no se separan en células HeLa (Díaz-Martínez y col., 2006). Sin embargo, los ratones mutantes para PIAS $\gamma$  son aparentemente normales (Wong y col., 2004) y en células MEF mutantes para PIAS $\gamma$  la sumoilación y posterior localización de Topo II en los centrómeros permanece intacta (Dawlaty y col., 2008). Por lo tanto, no está claro si existe un mecanismo secundario que actúe con actividad SUMO E3 ligasa en lugar de PIAS $\gamma$  cuando ésta está inactiva.

RanBP2 es una nucleoporina con actividad SUMO E3 ligasa *in vitro* (Pichler y col., 2002; Matunis y Pickart, 2005; Xu y Au, 2005) e *in vivo* (Dawlaty y col., 2008). El modelo de ratón mutante *RanBP2*<sup>-/-</sup> es letal en las primeras etapas embrionarias (Aslanukov y col., 2006). Además, se ha demostrado en células Hela que el defecto fundamental asociado a la ausencia de RanBP2 es la formación de puentes cromosómicos en anafase (Clarke y col., 1993), y también fallos en el alineamiento y segregación cromosómicos y en la formación del huso mitótico (Salina y col., 2003; Joseph y col., 2004). En cambio, la actividad SUMO E3 ligasa de RanBP2 sí que parece imprescindible para que Topo II se acumule en el centrómero. Esto se demostró ya que con células MEF de ratón en las que se ha ido disminuyendo progresivamente los niveles de expresión de RanBP2 existe un umbral en el que ya no se acumula Topo II en el centrómero provocando fallos en segregación y puentes entre cromátidas hermanas en anafase (Dawlaty y col., 2008).

La función de la Topo II también ha sido estudiada utilizando inhibidores (Cobb y col., 1997; Nitiss, 2009b). El más común es el Etopósido (ET ó VP-16) que es un inhibidor de la Topo II comúnmente usado en terapias contra el cáncer. Esta droga es un potente agente genotóxico (Ferguson y Baguley, 1994) que puede provocar tumores secundarios (Murphy, 1993) e infertilidad (Anderson y Berger, 1994), y cuya actividad radica en bloquear la actividad de la Topo II una vez se han cortado las moléculas de DNA concatenado pero previamente a que se produzca el religamiento (Nitiss, 2009b). En células germinales masculinas de humanos, el ET provoca fragmentaciones del DNA a nivel del centrómero (Kallio y Lahdetie, 1993; Kallio y Lahdetie, 1996) y la formación de micronúcleos (Sjoblom y col., 1994) mientras que en ratón provoca

aberraciones cromosómicas heredables y aneuploidías (Marchetti y col., 2001). También se han utilizado frecuentemente inhibidores como ICRF-193, el cual provoca fallos en la segregación y aberraciones cromosómicas (Tateno y Kamiguchi, 2002), y Merbarona que provoca bloqueo mitótico y aneuploidías (Kallio y Lahdetie, 1997) y cuya acción es previa al ET, pues bloquea la actividad de la Topo II previamente a que se produzca el corte de las hebras de DNA concatenadas (Fortune y Osherooff, 1998; Nitiss, 2009b). Estas dos últimas drogas actúan como venenos, es decir, no sólo inhiben la actividad sino también la localización de la Topo II.

Otra proteína que recientemente ha sido relacionada con Topo II es PICH, que pertenece a la familia de las SNF2, una familia de ATPasas que pertenecen a complejos proteicos remodeladores de la cromatina. PICH aparece en finos puentes de cromatina entre las cromátidas hermanas durante la anafase temprana mitótica de células HeLa (Baumann y col., 2007). Esos puentes consisten en DNA alfoide centromérico y su resolución y corte parece depender de la actividad de Topo II (Spence y col., 2007).

---

## ***Objetivos***





## OBJETIVOS

El objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral es analizar el fenómeno de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la meiosis de machos de ratón. Los objetivos concretos de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

1. Analizar la localización precisa de las cohesinas durante las divisiones meióticas en machos de ratón para inferir sus funciones.
2. Analizar la distribución relativa de las cohesinas estudiadas con respecto a los cinetocoros y la proteína estructural de los elementos axiales/laterales del complejo sinaptonémico SYCP3 durante las divisiones meióticas en machos de ratón mediante dobles inmunodetecciones.
3. Analizar la distribución precisa y posible función de las proteínas relacionadas con la funcionalidad del complejo de cohesina durante las divisiones meióticas en machos de ratón.
4. Analizar la localización precisa y funciones de la DNA Topoisomerasa II $\alpha$  como proteína implicada en la segregación entre cromátidas hermanas durante las divisiones meióticas en machos de ratón.



## ***Material y Métodos***







## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Material

#### 1.1. Animales

Para la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral se utilizaron como material de estudio túbulos seminíferos de ratones macho de laboratorio de la cepa C57BL/6 (*Mus musculus*). La dotación cromosómica de esta especie está constituida en machos por 38 autosomas y una pareja de cromosomas sexuales XY, siendo todos ellos telocéntricos (Kalitsis y col., 2006). Se seleccionaron machos adultos de entre tres y seis meses de edad sexualmente activos.

Por otro lado, también se utilizaron otros ratones fruto de colaboraciones con otros grupos de investigación:

Se utilizaron ratones mutantes portadores de una delección del gen *Sgol2* tanto en heterocigosis (*Sgol2*<sup>+/-</sup>) como en homocigosis (*Sgol2*<sup>-/-</sup>, *knockout*, KO). Los ratones fueron generados por el equipo del Dr. Alberto Pendás del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) en Salamanca, tal y como se detalla en el trabajo de investigación de Llano y col. (2008).

También se utilizaron ratones portadores de una mutación en heterocigosis del gen *rad51c* que genera la expresión hipomórfica de niveles muy bajos de la proteína RAD51C y a los que se les denomina *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>. Los ratones mutantes fueron generados por el equipo del Dr. Shyam K. Sharan del National Cancer Institute de Frederick, USA, tal como se detalla en el trabajo de investigación de Kuznetsov y col. (2007).

Así mismo, también se hizo uso de ratones macho de la cepa C57BL/6J portadores de un transgen *REC8-myc* (Kudo y col., 2006) que fueron amablemente cedidos por el Dr. Kim Nasmyth de la Universidad de Oxford, Inglaterra.

Todos los animales fueron mantenidos siguiendo la normativa vigente para la manipulación y el cuidado de animales de experimentación de acuerdo al RD 223/88, en condiciones óptimas de espacio, ambientales y bajo supervisión de un veterinario en el animalario del CBM (Centro de Biología Molecular). Los especímenes fueron sacrificados mediante dislocación cervical siguiendo la normativa europea 86/609/EEC. Toda la experimentación con animales está autorizada por el Ministerio

de Ciencia y Tecnología dentro de los proyectos “Regulación de las divisiones meióticas durante la espermatogénesis de mamíferos” (BFU2005-05668-C03-01) y “Análisis de los mecanismos reguladores de la asociación entre cromátidas hermanas durante la meiosis” (BFU2008-00300/BMC), y de los proyectos cofinanciados para Creación o Consolidación de Grupos de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid “Cohesión entre cromátidas hermanas en la meiosis de mamíferos” e “Implicación de la DNA Topoisomerasa II $\alpha$  en la meiosis de ratón” (CCG06-/UAM/SAL-0260).

En todos los casos, los túbulos seminíferos se obtuvieron tras extirpar y retirar la túnica albugínea de los testículos, y fueron procesados siguiendo los procedimientos que se explican en el epígrafe Métodos.

### **1.2. Cultivos y líneas celulares**

Para el estudio de algunas proteínas durante la mitosis se utilizaron las siguientes líneas celulares en cultivo:

Células 3T3. Es una línea de fibroblastos de ratón immortalizados. Estas células fueron cultivadas en condiciones estériles a 37°C en atmósfera húmeda con un contenido de CO<sub>2</sub> del 5%, en frascos de cultivo F-25 con medio Dulbecco con la modificación Eagle (DMEM, Cambrex) que contenía un 10% p/v de suero fetal de ternera (Gibco), 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y 2 mM de L-glutamina (Cambrex).

Células Pam 212. Se trata de una línea de queratinocitos epidérmicos murinos immortalizada. Las células fueron cultivadas en las mismas condiciones que las células 3T3.

Células humanas HeLa. Las células fueron cultivadas en condiciones estériles a 37°C en atmósfera húmeda con un contenido de CO<sub>2</sub> del 5%, en frascos de cultivo F-25 con medio Dulbecco con la modificación Eagle (DMEM) que contenía un 10% p/v de suero fetal de ternera (BSA), 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y un 1% de L-glutamina 0,2 M (todos de Imperial Laboratories).

## **2. Métodos**

### **2.1. Obtención de espermatoцитos**

#### **2.1.1. Aplastado de túbulos seminíferos**

Para realizar las preparaciones se aplicó el protocolo de aplastado de túbulos seminíferos descrito previamente (Page y col., 1998; Parra y col., 2002). Esta técnica consiste en fijar los túbulos seminíferos con formaldehído al 2% en PBS conteniendo un 0,1% de Triton X-100 (Sigma) durante 5-10 minutos.

Dicho fijador se elaboró añadiendo 2,5 ml de formaldehído al 40% (BDH AnalaR) y 25 µl de Triton X-100 a 45 ml de PBS. Se disolvió el Triton X-100 mediante agitación suave para evitar la formación de espuma y se completó el volumen hasta 50 ml con PBS. El tiempo de fijación del material fue de entre 5 y 20 minutos aproximadamente.

En el caso en que los anticuerpos rindieron una señal inmunofluorescente muy débil o nula se probó a realizar una fijación alternativa con Formaldehído-Triton-metanol. Tras haber fijado con formaldehído-Triton, y después de haber levantado el cubreobjetos tras la inmersión de la preparación en nitrógeno líquido, se lavaron las preparaciones durante 5 minutos con PBS y se realizó una post-fijación del material con metanol (Panreac) a -20°C, durante 10 minutos.

Para la realización de los aplastados, en primer lugar se limpian los portaobjetos con una solución 1:1 de etanol:acetona, y posteriormente se recubren con 1mg/ml de poli-L-lisina (Sigma, P-8920). La poli-L-lisina se utilizó para conseguir una mayor adherencia de las células al portaobjetos. Posteriormente se depositan sobre los portaobjetos varios fragmentos de túbulos seminíferos sobre una gota de fijador y se trocearon con la ayuda de una pinza de puntas curvas. Tras colocar encima un cubreobjetos, los túbulos se dispersan con la ayuda de un lápiz de grafito y sujetando el cubreobjetos con una almohadilla de papel de filtro. A continuación se seca el exceso de fijador con ese mismo papel. Cuando el material se ha dispersado y se ha retirado el exceso de fijador se ejerce presión con el dedo pulgar sobre el cubreobjetos para aplastan hasta conseguir una monocapa celular.

Si las preparaciones van a ser utilizadas de inmediato se congelan sumergiéndolas en nitrógeno líquido y se procede a levantar el cubreobjetos con la ayuda de una cuchilla, y se sumergen en PBS para su posterior uso. Las preparaciones que van a ser

empleadas tras su preparación se congelan en nitrógeno líquido, y sin levantar el cubreobjetos se almacenan en una nevera a -80°C hasta su utilización.

Con este protocolo obtenemos preparaciones de espermatoцитos de ratón en monocapa que son inmunoreactivos y que gracias a las características de la técnica mantienen el volumen celular y por tanto la relación espacial original de las estructuras celulares.

PBS	Cloruro sódico (NaCl) .....	8 g
	Cloruro potásico (KCl) .....	0,2 g
	Fosfato disódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	1,44 g
	Fosfato potásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	0,2 g
	Enrasar a un litro con agua destilada y ajustar a pH 7,2-7,4.	

### **2.1.2. Esparcido de espermatoцитos**

Para realizar los esparcidos de los espermatoцитos se siguió la técnica previamente descrita por Peters y col. (1997). Los túbulos seminíferos se disgregaron en un pequeño volumen de PBS y mediante la fricción de los mismos entre dos pinzas curvas dentadas se obtuvo una suspensión celular que se recuperó en un tubo de centrifuga. Tras centrifugarse durante 8 minutos a 1200 r.p.m. el sobrenadante se eliminó y se añadieron 3 ml de PBS. Posteriormente se repitió una segunda centrifugación de forma idéntica. El precipitado así obtenido fue resuspendido lenta y cuidadosamente en un pequeño volumen de sacarosa 100 mM evitando la formación de agregados de células. La duración del choque hipotónico fue de 7 minutos.

Los portaobjetos fueron limpiados con una solución 1:1 de etanol:acetona y se sumergieron en una solución fijadora de paraformaldehído al 1% en agua destilada con un 0,15% de Triton X-100 (pH 9,2).

El fijador se preparó de la siguiente manera: en un Erlenmeyer de vidrio se añadieron 90 ml de agua destilada, se añadió 1 g de paraformaldehído (Panreac) y se añadieron 3 gotas de NaOH 5N. Dicho Erlenmeyer fue tapado con Parafilm (American Nacional Can) y tras realizarle varias perforaciones para permitir la salida de vapores se introdujo en un baño a 60°C. La solución se agitó frecuentemente en el baño hasta observar que carecía de precipitados y su aspecto era transparente. Tras enfriar la solución en agua corriente bajo el grifo se añadieron dos pipetas Pasteur completas de

tetraborato sódico ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) 50 mM en agua destilada. La solución se ajustó a pH 9,2-9,5 con HCl 0,1N y NaOH 0,1N y se agregaron 150  $\mu\text{l}$  de Triton-X100, quedando a una concentración final del 0,15%. Finalmente se completó con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

Una vez sacados los portaobjetos del fijador se inclinaron con el propósito de concentrar en una de las esquinas el pequeño volumen de líquido restante, donde se depositaron 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión de meiocitos. Se repartió homogéneamente la suspensión por toda la superficie del portaobjetos, dejando secar las preparaciones en posición horizontal a temperatura ambiente durante 2 horas en una cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron los preparados 4 ó 5 veces haciendo resbalar sobre ellos una disolución de Photoflo (Kodak) al 0,08%. Finalmente, se dejaron secar al aire hasta su uso, siendo entonces necesario realizar una rehidratación durante 15 minutos en PBS.

Las preparaciones obtenidas por este método pueden ser preservadas en buen estado hasta su uso almacenándolas en seco a  $-80^\circ\text{C}$  o sumergidas en PBS con un 0.1% de azida sódica (Serva) a  $4^\circ\text{C}$ .

## **2.2. Utilización de células de cultivos celulares**

Las células 3T3, PAM212 y HeLa fueron crecidas en cubreobjetos 22 x 22 mm durante 48 horas en un ambiente estéril y bajo las condiciones de nutrientes, temperatura, y  $\text{CO}_2$  adecuados. Cuando se necesitaron se lavaron con PBS y posteriormente se fijaron con Fijación con Formaldehído-Triton a temperatura ambiente durante 30 minutos directamente sobre el cubreobjetos de cristal donde habían sido crecidas. Las posteriores inmunodetecciones se llevaron a cabo también sobre los cubreobjetos.

## **2.3. Inmunolocalización de proteínas**

Las preparaciones obtenidas con la técnica de aplastado, esparcido o los cubreobjetos con células cultivadas se lavan tres veces durante 5 minutos en PBS previamente a la realización de las inmunodetecciones indirectas. Los anticuerpos primarios se incubaron bien durante 45 minutos a temperatura ambiente, o bien toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  (ver Tabla 2). A continuación, las preparaciones se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los correspondientes anticuerpos secundarios dependiendo de

la especie-especificidad (ver Tabla 3). Tras tres lavados de 5 minutos en PBS, se contratiñeron las preparaciones con 2 µg/ml de DAPI durante 3 minutos. Después de un último lavado en PBS se montaron los cubreobjetos con un montante que evita el desvanecimiento rápido de la fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories) y se sellaron con esmalte de uñas. Las preparaciones se almacenan a 4°C hasta su observación.

Para la realización de las inmunodetecciones indirectas se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en PBS: anticuerpos contra proteínas centroméricas/cinetocóricas presentes en sueros humanos autoinmunes anti-centrómero; anticuerpos contra la proteína SYCP3 de los EAs/ELs; anticuerpos contra las cohesinas REC8, RAD21, SMC3, SMC1 $\alpha$  SMC1 $\beta$ , STAG1, STAG2 y STAG3; anticuerpos contra las proteínas relacionadas con el complejo de cohesina PDS5A, PDS5B, WAPL y Sororina; anticuerpos contra las Shugoshinas SGOL1 y SGOL2; anticuerpos contra la fosfatasa PP2A; anticuerpos contra  $\alpha$ -Tubulina; anticuerpos contra la proteína de la lámina externa del cinetocoro CENP-E; anticuerpos contra las quinasas BubR1, y PLK1; un anticuerpo contra la quinesina MCAK; anticuerpos contra las histonas  $\gamma$ H2AX y H1t; anticuerpos contra las proteínas pasajeras del dominio interno del centrómero Aurora-B e INCENP; anticuerpos contra la Topoisomerasa II $\alpha$ ; anticuerpos contra las proteínas reguladoras de Topo II RanBP2, RanGAP1, PIAS $\gamma$ , SUMO2/3 y Ubc9; un anticuerpo contra la proteína PICH, y anticuerpos contra las ciclinas Ciclina A y Ciclina B1. Los detalles de los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se resumen a continuación en las Tablas 2 y 3.

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
Proteína	Anticuerpo	Procedencia	Referencia	Tipo de Ac	Dilución de uso
<b>Proteínas centroméricas</b>	ACA MM	Dr. Manuel Valdivia	(Valdivia y col., 1998)	Policlonal humano	1:100
	ACA	Antibodies Incorporated	15-235 lote 428-4JH-17	Policlonal humano	1:50
<b>SYCP3</b>	hámster SYPC3	Abcam	ab82289	Monoclonal de ratón	1:100
	rSYPC3	Dr. Ricardo Benavente	(Alsheimer y Benavente, 1996)	Policlonal de cobaya	1:100
	K921	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2004)	Policlonal de conejo	1:50
	K1034	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:50
<b>REC8</b>	mREC8*	Dr. Christer Höög	(Kouznetsova y col., 2005)	Policlonal de cobaya	1:10
	mK1018*	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:10
	mK1019*	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:10
	K885*	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2004)	Policlonal de conejo	1:25
	mREC8	Dr. Jibak Lee	(Lee y col., 2003)	Policlonal de conejo	1:10
	hREC8*	Sant Cruz	E-18 sc-15152 lote A082	Policlonal de cabra	1:10
	mREC8*	Abcam	Ab-38372	Policlonal de conejo	1:10
	mREC8-p*	Abcam	Ab-56151	Policlonal de conejo	1:10
<b>RAD21</b>	hRAD21	Dra. Yokomori	(Gregson y col., 2001)	Policlonal de conejo	1:20
	K854	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2002)	Policlonal de conejo	1:25
	mRAD21	Upstate	05-908 lote 30391	Policlonal de conejo	1:10
	hRAD21*	Bethyl	A300-268 A	Policlonal de conejo	1:10
	hRAD21*	Abcam	ab-16473 CM110-2C10	Monoclonal de ratón	1:10
<b>SMC1<math>\alpha</math></b>	hSMC1 $\alpha$ *	Dra. Yokomori	(Gregson y col., 2001)	Policlonal de conejo	1:10
	hSMC1 $\alpha$ *	Chemicon	AB3914	Policlonal de conejo	1:40
	hSMC1 $\alpha$ * k988	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:25
<b>SMC1<math>\beta</math></b>	mSMC1 $\beta$ *	Dr. Christer Höög	(Kouznetsova y col., 2005)	Policlonal de cobaya	1:10
	#21*, #70*, #76*	Dr. Rolff Jessberger	(Revenkova y col., 2001)	Monoclonales de ratón	1:2

	K974*	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2004)	Policlonal de conejo	1:20
	hSMC1 $\beta$ *	Santa Cruz	C-16 sc27961	Policlonal de cabra	1:10
<b>SMC3</b>	SMC3*	Dr. Rolff Jessberger	(Stursberg y col., 1999)	Policlonal de conejo	1:25
	K987	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2004)	Policlonal de conejo	1:25
	hSMC3	Chemicon	AB3914 lote 0607036536	Policlonal de conejo	1:40
	hSMC3*	Bethyl	S3000-060 lote S300-060-1	Policlonal de conejo	1:25
	hSMC3* fosforilada (pSer383)	Bethyl	A3000-061A lote A300-061A-1	Policlonal de conejo	1:25
	hSMC3	Abcam	ab 9263	Policlonal de conejo	1:10
	hSMC3*	Santa Cruz	R.19 sc.8198	Policlonal de cabra	1:10
<b>STAG1</b>	hSTAG1 K923*	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:10
<b>STAG2</b>	hSTAG*	Abcam	ab-4463	Policlonal de cabra	1:10
	K828*	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2002)	Policlonal de conejo	1:25
<b>STAG3</b>	mSTAG3*	Dr. Christer Höög	(Kouznetsova y col., 2005)	Policlonal de cobaya	1:10
	K403	Dr. José Luis Barbero	(Prieto y col., 2001)	Policlonal de conejo	1:50
	mSTAG3*	Santa Cruz	D-20 Sc-20341 lote C1103	Policlonal de cabra	1:10
<b>PDS5A</b>	xPDS5A* Rec1 afR105-3	Dra. Ana Losada	(Losada y Hirano, 2005)	Policlonal de conejo	1:25
	xPDS5A* Rec2 afR106-3	Dra. Ana Losada	(Losada y Hirano, 2005)	Policlonal de conejo	1:25
	xPDS5A* afR77-5	Dra. Ana Losada	(Losada y Hirano, 2005)	Policlonal de conejo	1:25
	mPDS5A* #48	Dra. Ana Losada		Policlonal de conejo	1:10
	mPDS5A* #49	Dra. Ana Losada		Policlonal de conejo	1:10
<b>PDS5B</b>	hPDS5B afR115	Dra. Ana Losada	(Losada y Hirano, 2005)	Policlonal de conejo	1:25
	mPDS5B C100 N-ter	Dr. José Luis Barbero	(Pichler y col., 2002)	Policlonal de conejo	1:10
	mPDS5B C101 C-ter*	Dr. José Luis Barbero	(Pichler y col., 2002)	Policlonal de conejo	1:10
	mPDS5B*	Abcam	ab-60060	Monoclonal de ratón	1:10



	hPDS5B*	Bethyl	A300-537 A	Policlonal de conejo	1:10
<b>WAPL</b>	WAPL	Dr. Masahiko Kuroda	(Kuroda y col., 2005)	Policlonal de conejo	1:10
	WAPL* #C-ter #N-ter #P-rec	Dr. Tatsuya Hirano	(Gandhi y col., 2006)	Policlonal de conejo	1:10
	hWAPL	Abcam	ab-56981	Monoclonal de ratón	1:10
	hWAPL*	Bethyl	A300-268A	Policlonal de conejo	1:10
	hWAPL*	AbNova	H00023063-B01	Policlonal de ratón	1:10
	hWAPL*	AbNova	H00023063-M02	Monoclonal de ratón	1:10
<b>Sororina</b>	Soronin*	Santa Cruz	M-190 sc-67248 lote A2808	Policlonal de conejo	1:10
	Sororin 2E10*	Dra. Susana Rankin	(Rankin y col., 2005)	Monoclonal de ratón	1:10
<b>SGOL1</b>	mSGOL1 #K1041* # K1042*	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:10
	hSGOL1 944	Dr. Jan-Michael Peters	(McGuinness y col., 2005)	Policlonal de conejo	1:10
	hSGOL1*	Abcam	ab21633 lote 157943	Policlonal de conejo	1:10
	hSGOL1*	Abcam	ab58026	Monoclonal de ratón	1:10
	mShugoshin*	Abcam	ab58023 lote 432779	Monoclonal de ratón	1:10
	mSGOL1	Dr. Stephen Taylor	(Perera y col., 2007)	Policlonal de conejo	1:10
	hSGOL1*	Dr. Tim Yen	(Huang y col., 2007)	Policlonal de rata	1:10 en HeLa
<b>SGOL2</b>	mSGOL2 #1058 #1059	Dr. José Luis Barbero	(Gómez y col., 2007)	Policlonal de conejo	1:10
	hSGOL2*	Dr. Tim Yen	(Huang y col., 2007)	Policlonal de rata	1:10
<b>PP2A</b>	hPP2A*	Santa Cruz	FL-309 sc-14020	Policlonal de conejo	1:10
	PP2A-C*	Upstate	05-421	Monoclonal de ratón	1:10
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	anti- $\alpha$ -tubulina	Sigma	N-357	Monoclonal de ratón	1:100
	YL1/2	Abcam	ab-6160	Monoclonal de rata	1:100
<b>CENP-E</b>	Rabbit 1.6	Dr. Tim Yen	(Lombillo y col., 1995)	Policlonal de conejo	1:100

<b>BubR1</b>	hBubR1 SBR1.1	Dr. Stepehn Taylor	(Johnson y col., 2004)	Policlonal purificado de oveja	1:100
	hBubR1	Dr. Tim Yen	(Chan y col., 1999)	Policlonal purificado de conejo	1:100
<b>PLK1</b>	mPLK1	Zymed	33-1700 lote 21274835	Monoclonal de ratón	1:20
	mPLK1	Abcam	ab-14209	Policlonal de conejo	1:10
<b>MCAK</b>	hMCAK	Dra. Linda Wordeman	(Wordeman y Mitchison, 1995)	Policlonal de oveja	1:40
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b>	$\gamma$ -H2AX	Upstate	05-636 lote 32526	Monoclonal de ratón	1:500- 1:1000
<b>H1t</b>	H1t	Dra. Mary Ann Handel	(Cobb y col., 1999a)	Policlonal de cobaya	1:100
<b>Aurora-B</b>	AIM-1	Transduction Labs	A78720-050	Monoclonal de ratón	1:30
<b>INCENP</b>	hINCENP suero 1186	Dr. William Earnshaw	(Eckley y col., 1997)	Policlonal de conejo	1:100
<b>TopoII <math>\alpha</math></b>	mTopo II $\alpha$ #K1088 #K1089	Dr. José Luis Barbero		Policlonal de conejo	1:10
	mTopo II $\alpha$ 4E12	Dr. Akihiko Kikuchi	(Sakaguchi y Kikuchi, 2004)	Monoclonal de ratón	1:10
	hTopoII $\alpha$	TopoGen	#2011-1	Policlonal de conejo	1:10
<b>RanBP2</b>	RanBP2	Dr. Franke Melrior	(Pichler y col., 2002)	Policlonal de cabra	1:10
<b>RanGAP1</b>	RanGAP1	Dr. Franke Melrior	(Pichler y col., 2002)	Policlonal de cabra	1:10
<b>SUMO 2/3</b>	8A2	Dr. Xiang-Dong Zhang	(La Salle y col., 2008)	Monoclonal de ratón	1:10
<b>Ubc9</b>	UBC9*	Transduction Lab.	TL: 610748 #02050	Monoclonal de ratón	1:10
	UBC9*	Abgent	AP1261a #SH030723E	Policlonal de conejo	1:10
<b>PIAS<math>\gamma</math></b>	PIAS $\gamma$ *	Santa Cruz	sc 50348	Policlonal de conejo	1:10
<b>PICH</b>	hPICH*	Dr. Nigg	(Baumann y col., 2007)	Policlonal de conejo	1:10
<b>Ciclina A</b>	mCyclin A	Santa Cruz	C-19 sc-596 Lote H2306	Policlonal de conejo	1:10
	mCy A*	Santa Cruz	H-432 sc-751 Lote F0206	Policlonal de conejo	1:10
<b>Ciclina B</b>	hámster Ciclina B	Santa Cruz	V-152 sc-7846 Lote F0806	Policlonal de cabra	1:10

**Tabla 2.** Listado de anticuerpos primarios utilizados.

Los anticuerpos marcados con asterisco no dieron ningún resultado positivo tras varias pruebas con diferentes tipos de fijación.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Tipo de anticuerpo	Procedencia	Fluorocromo acomplejado	Dilución de uso
Cabra anti-fracción Fab' de IgGs de ratón	Jackson (115-097-003)	Fluoresceína	1:100
Burro ML anti-IgGs de ratón	Jackson (709-095-149)	Fluoresceína	1:150
Burro ML anti-IgG y M de ratón	Jackson (709-075-149)	Texas Red	1:150
Cabra anti-fracción Fab' de IgGs de conejo	Jackson (111-097-003)	Fluoresceína	1:100
Burro ML anti IgGs de conejo	Jackson (711-095-152)	Fluoresceína	1:150
Burro ML anti IgGs de conejo	Jackson (711-075-152)	Texas Red	1:150
Burro anti-fracción Fab' de conejo	Jackson (711-076-152)	Texas Red	1:100
Burro anti IgGs de cobaya	Jackson 706-095-148	Fluoresceína	1:150
Burro anti IgGs de cobaya	Jackson 706-075-148	Texas Red	1:150
Conejo anti IgGs humanas	Sigma F-4512	Fluoresceína	1:150
Cabra anti-IgGs humanas	Jackson (109-075-088)	Texas Red	1:150
Burro ML anti-IgGs de oveja	Jackson (713-095-147)	Fluoresceína	1:150
Burro ML anti-IgGs de oveja	Jackson (713-075-147)	Texas Red	1:150
Burro anti-IgGs de cabra	Molecular probes A 11045	Alexa 488	1:200
Burro anti-IgGs de cabra	Molecular probes A 11058	Alexa 594	1:200

**Tabla 3.** Listado de anticuerpos secundarios utilizados.

## 2.4. Técnicas de inhibición

### 2.4.1. Inyecciones intraperitoneales de colchicina

La colchicina ( $C_{22}H_{25}NO_6$ ) es un alcaloide extraído de *Colchicum autumnale* que inhibe la polimerización de los MTs y por lo tanto bloquea la división celular. Se preparó una disolución de uso de 2,4 mg/ml de colchicina (Sigma) en PBS. Se procedió a la administración de una concentración de droga de 80 mg/kg atemperándola a 37°C e inyectando intraperitonealmente la misma a los animales previamente anestesiados. Se administró un volumen de 1 ml de solución. Los especímenes fueron vigilados y tres horas después se sacrificaron y se diseccionaron para extraerles los testículos.

### 2.4.2. Inyecciones intraperitoneales de Etopósido

El Etopósido, ET o VP-16 (Glucósido de Dimetil Epipodofilotoxina Etilidina) es un derivado semisintético de la podofilotoxina que inhibe la acción de Topo II $\alpha$  pero no su localización. Se prepararon soluciones de 50 mg/kg, 60 mg/kg, 80 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg de ET (Sigma Aldrich E1383) disueltas en DMSO (Dimetil sulfóxido, Sigma D-5879). Se procedió a la administración de la droga atemperándola a 37°C e inyectando intraperitonealmente la misma a los animales previamente anestesiados. Se seleccionaron animales juveniles de entre 19 y 28 días y animales adultos de 2-3 meses de edad. Se administró un volumen de 0,5 ml de solución. Los especímenes fueron vigilados y se sacrificaron a las 5, 24, 48 horas y se diseccionaron para extraerles los testículos.

## 2.5. Ensayo TUNEL

El ensayo TUNEL (*TdT-mediated dUTP-X nick End Labeling*) es una técnica que permite la detección de células apoptóticas en aplastados de túbulos seminíferos (o en células en suspensión) con el fin de averiguar si las modificaciones que fomentan los inhibidores de proteínas utilizadas llevan a las células a un proceso de muerte celular programada. Hemos utilizado el protocolo “*In situ Cell Death Detection Kit*” de la casa comercial ROCHE (nº catálogo 11684795910). El kit está basado en la detección de las roturas de DNA sencillas y dobles que ocurren en las etapas tempranas del proceso de apoptosis.

El protocolo consiste en añadir a la muestra (que en nuestro caso concreto serán aplastados de túbulos seminíferos de machos de ratón) 30 µl de una “solución mezcla” o “solución TUNEL” compuesta por “solución enzimática” y “solución de marcaje”.

Solución enzimática: TdT: Terminal Deoxittransferil Transferasa

Solución de marcaje: TMR-dUTP-Fluoresceína

Solución TUNEL: 3,86 µl de solución enzimática + 26,13 µl de solución de marcaje

Las preparaciones se incuban con la solución TUNEL durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Al añadir la mezcla a las preparaciones, la Tdt cataliza la adición de TMR-dUTP a los grupos 3'-OH libres de las hebras rotas de DNA, y estos nucleótidos dUTP se marcan con fluoresceína con la solución de marcaje. Posteriormente se procede a realizar tres lavados de 5 minutos con PBS y por último a montar las preparaciones con Vectashield. Las preparaciones son analizadas mediante microscopía de fluorescencia.

## **2.6. Electroforesis y *Western Blot***

### **2.6.1. Técnica de extracción de proteína de testículo de ratón**

Para la obtención de extracto proteico de testículo de ratón en primer lugar se extrajo el testículo y se eliminó la túnica albugínea (el material se puede congelar o utilizar fresco, si se congela es mejor hacerlo primero en nitrógeno líquido y luego guardarlo a -80°C). Posteriormente se depositaron los túbulos seminíferos en un “potter” en hielo con 1 ml de solución de solubilización SDS al que se le añadió un 1% de un cóctel inhibidor de proteasas (Sigma). Se homogenizó bien y se puso a hervir 5 minutos a 90°C una solución elaborada con 15 µl de extracto y 5 µl de solución de electroforesis 5X por cada pocillo que se va a cargar, agujereando con una aguja la tapa de los tubos Eppendorf para que no estallen.

Solución de solubilización SDS (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; EDTA 5 mM; SDS 3%):

Tris-HCl 1 M pH 6,8	50 µl
EDTA 0,1 M	50 µl
SDS 20%	150 µl
Agua destilada	hasta 1 ml

Solución de electroforesis 5X (La solución de electroforesis 1X está compuesta por Tris-HCl 62,2 mM pH 6,8; β-Mercaptoetanol 5%; SDS 2% Glicerol 10%; Azul de bromofenol 0,005%):

SDS	2 g
β- Mercaptoetanol	5 ml
Glicerol 87%	11,5 ml
Azul de bromofenol	5 mg
Tris-HCl 2 M pH 7,0	3,12 ml
Agua destilada	hasta 20 ml

Los extractos proteicos que nos se van a utilizar inmediatamente pueden guardarse en una nevera a -80°C hasta su utilización.

### 2.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida se prepararon los geles de acrilamida al porcentaje necesario según (Laemmli, 1970) y se cargan lo más rápido posible para que su polimerización fuera homogénea. Se añadió un poco de agua por encima y se dejó solidificar. Tras su polimerización, se preparó el gel superior (“*stack gel*”) según los protocolos establecidos. Se eliminó el agua depositada sobre el primer gel con papel de filtro, se depositó el gel superior y se colocó el peine con cuidado de no hacer burbujas, y se dejó polimerizar. Se colocaron los geles en la cubeta de electroforesis (*Mini Protean Bio-Rad* modelo 1000/500) y se llenó con tampón de electroforesis.

Tampón de electroforesis (25 mM Tris (hidroximetil-aminometano), 192 mM Glicina, 0,1% SDS), pH final 8,3:

Tris-HCl	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
Agua destilada	hasta 1 L

Finalmente se retiraron los peines con cuidado y se cargaron los pocillos con los extractos, cargando uno de ellos en cada gel con 5 µl de un marcador de pesos moleculares preteñidos (Bio-Rad, amplio rango 16611-0318). A continuación se conecta la cubeta a la fuente de alimentación (Bio-Rad, modelo 1000/500) y se selecciona un voltaje de 120-140V.

### 2.6.3. *Western Blot*

Sobre el soporte de transferencia (placa negra) se colocó una esponja mojada en el tampón de transferencia y sobre ella un papel grueso para transferencia (Bio-Rad 153880) también mojado en el tampón. Encima se depositó el gel y sobre él la membrana de transferencia (*Bio-Rad Trans-Blot Transfer Medium*, 162-0115) mojada en tampón con cuidado de que no quedasen burbujas. Seguidamente se puso otro papel grueso para transferencia y otra esponja, todos ellos mojados en tampón de transferencia.

Tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; Glicina 192 mM SDS 0,01%): Se prepara 10X y se diluye añadiendo un 20% de metanol.

Trizma-base (Sigma)	30 g/l
Glicina	144 g/l
SDS	1 g/l
Agua destilada	hasta 1 L

Una vez preparados los soportes se colocaron en la cubeta llena de tampón, y se realizó la transferencia en frío a 310 mA durante 1 hora y 30 minutos. Finalmente se desmontaron los soportes con cuidado y se lavaron las membranas con Tween 20 al 0,005% en PBS durante 10 minutos.

Las membranas se volvieron a lavar con PBS otros 10 minutos y se incubaron con un 4% de leche desnatada en polvo (Nestlé Sveltesse) en PBS durante 20 minutos. Tras esto se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución anterior durante 1 hora. Posteriormente se lavaron 5 minutos con PBS, otros 5 minutos con PBS/Tween 20 y finalmente otros 10 minutos en PBS. Se incubó con el anticuerpo secundario de burro que reconoce IgGs de conejo unido a peroxidasa (Amersham) diluido 1:5.000 en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se lavó tres veces durante 10 minutos cada una con PBS/Tween 20, y una vez más con PBS.

Posteriormente se procedió a realizar el revelado del anticuerpo secundario con un sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham, RPN 2106 Batch109) según las instrucciones del fabricante. Para ello se colocó la membrana entre dos plásticos lisos y transparentes para evitar que se moje la película radiográfica (Kodak X-OMAT UV). Se colocó encima la película y se expuso en total oscuridad aproximadamente 1 minuto. Posteriormente la película se reveló con el revelador de papel autorradiográfico (Kodak- LX24) 1 minuto a unos 22°C utilizando un filtro para rayos X en la lámpara (Kodak GBX-2). Las películas fueron escaneadas con el escáner Mustek 1200SP y tratadas con el programa Adobe Photoshop 7.0.

## **2.7. Inmunoprecipitación**

Este protocolo fue amablemente facilitado por Ana Cuadrado, del laboratorio del Dr. José Luis Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid.

En primer lugar se añaden 2 µl del anticuerpo X por cada 70 µl de extracto de proteínas (sin *buffer* de carga). Se incuba toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se añaden 20 µl de proteína A (Invitrogen cat. 15918-014) por cada 70 µl de extracto, y se deja durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación se centrifuga la solución durante 2 minutos a 2000rpm. Se guarda el sobrenadante que corresponde a la fracción de proteína que no se ha asociado al anticuerpo y que servirá de control.



Posteriormente se hacen cuatro lavados por centrifugación de la siguiente manera: se añade 1 ml de *buffer* B al *pellet* de precipitación, se resuspende y se centrifuga 2 minutos a 2000rpm. En todos los casos se guardan los sobrenadantes para futuros controles.

#### *Buffer* B

Inhibidores	100 µl
HEPES 1M	200 µl
Glicerol	2 ml
KCL 3M	0,33 ml
EDTA 0.5 M	4 µl
Agua destilada	hasta 10ml

Inhibidores: Complete mini, EDTA free (ROCHE 11836170001).

Añadir al *pellet* resultante de las centrifugaciones 30 µl de *buffer* de carga por cada 70 de extracto inicial. Posteriormente calentar a 90°C durante 7 minutos.

Por último cargar el gel de azarosa. A partir de este momento el protocolo prosigue como un *Western Blot* normal. Es conveniente cargar un pocillo con el extracto puro, otro con el *pellet* de precipitación (que será la proteína X acoplada a su correspondiente anticuerpo y a su vez unidos a la proteína A) y otro con el sobrenadante (fracción del extracto que no se ha pegado a la proteína A).

Para realizar una “*coimmunoprecipitación*” de dos proteínas, se procederá a precipitar junto a la proteína A una determinada proteína “1”, y a continuación se intentarán detectar en ese precipitado mediante *Western Blot* la misma proteína “1” y a su vez una segunda proteína “2”. Si el anticuerpo contra la proteína “1” se detecta positivamente en el precipitado significará que efectivamente la proteína “1” se unió a la proteína A. Si el anticuerpo contra la proteína “2” se detecta positivamente en el precipitado significará que las proteínas “1” y “2” forman un complejo estable, si por el contrario no se detecta en el precipitado sino en el sobrenadante significará que las ambas proteínas no forman complejo de forma permanente.

## **2.8. Captura y procesamiento de imágenes**

Las observaciones se realizaron en dos microscopios de epifluorescencia Olympus BX-61 que están equipados con motorización de la platina en el eje Z para la captura de imágenes secuenciales y acoplados bien a una cámara digital DP-50 o DP-70. Ambos microscopios están dotados con los filtros adecuados para la observación de los distintos fluorocromos acoplados a los anticuerpos secundarios, y de DAPI para la tinción de la cromatina. El procesamiento de las imágenes se realizó con los *softwares* AnaLysis e ImageJ (National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Ambos programas permiten realizar proyecciones de planos para la creación de las imágenes que conformarán las figuras mostradas, la generación de videos (incluidos en el material suplementario), la obtención de anaglifsos y la reconstrucción tridimensional de imágenes.

## ***Resultados***





## RESULTADOS

### 1. Dinámica de SYCP3 y cinetocoros en la meiosis de ratón

Como primera aproximación en nuestros estudios del fenómeno de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la meiosis de ratón decidimos analizar detalladamente el patrón de localización y dinámica de una proteína concreta, con objeto de conocerla bien y poder utilizarla como marcaje de referencia en futuras inmunolocalizaciones en las que no conociéramos el ciclo de otra proteína. Por ello, escogimos a la proteína de los EAs/ELs del CS SYCP3, así como la señal que presentan los sueros anticentrómero (ACA), los cuales marcan los cinetocoros, y analizamos ambos patrones de localización durante la primera y la segunda división meiótica en aplastados de túbulos seminíferos de ratón. Se han realizado pruebas con diferentes anticuerpos (ver Tabla 2 en Material y Métodos), pero las imágenes mostradas para SYCP3 y los cinetocoros corresponden a los sueros comerciales de las casas Santa Cruz y Antibodies Incorporated, respectivamente.

Hemos utilizado la técnica de aplastado ya que mantiene el volumen celular durante la profase-I, así como la posición relativa y la condensación de los cromosomas durante las divisiones, de modo que permite de manera inconfundible el reconocimiento de las diferentes etapas meióticas (Suja y col., 1999; Parra y col., 2003).

Para facilitar la comprensión de los resultados, es este punto debemos recordar que toda la experimentación sobre los estudios de meiosis que se resumen esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en ratones de la especie *Mus musculus*, cuya dotación cromosómica está constituida en machos por 38 autosomas y una pareja de cromosomas sexuales XY, siendo todos ellos telocéntricos.

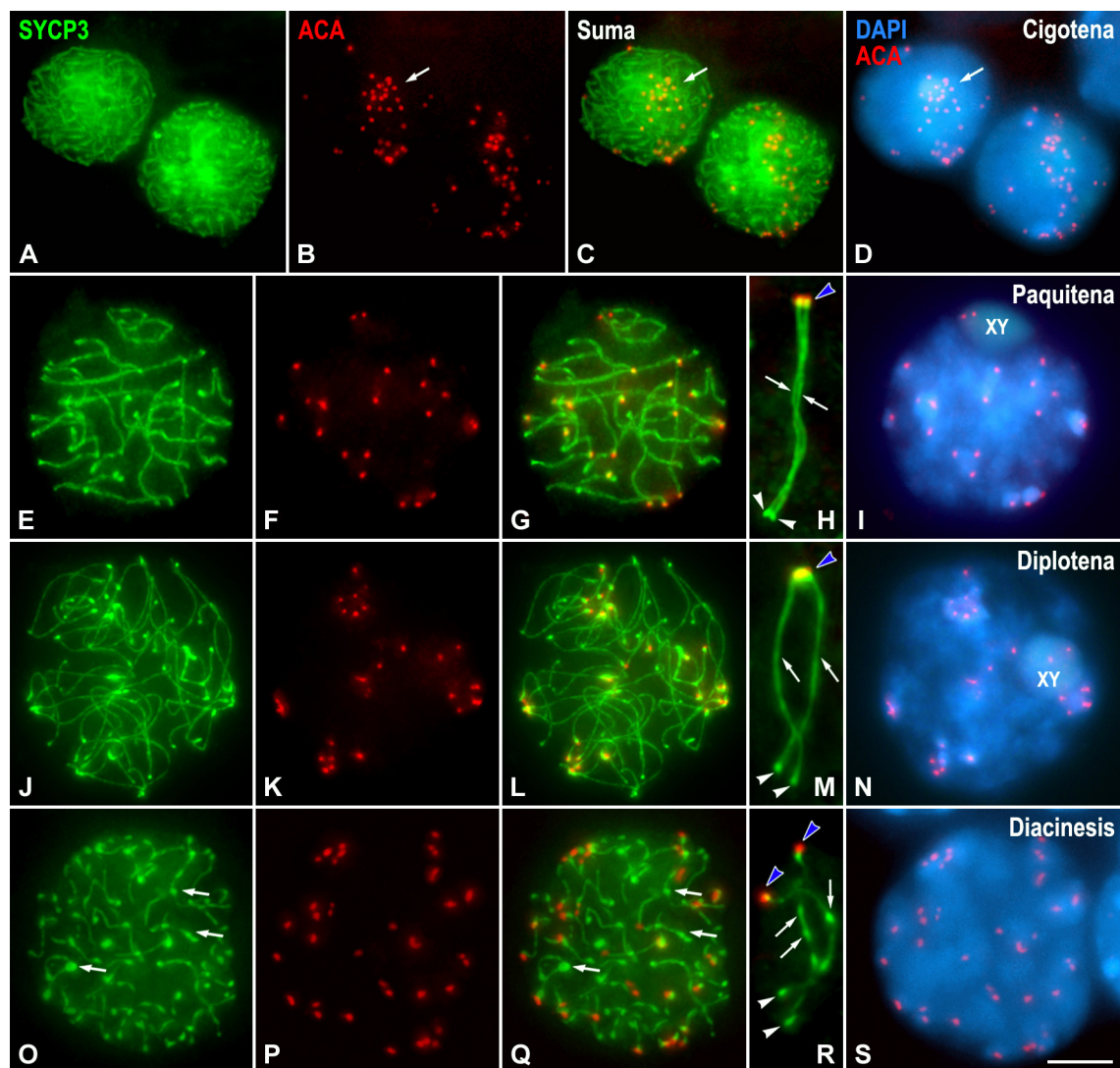
El autoanticuerpo contra proteínas centroméricas (ACA) marca una señal redondeada en los cinetocoros de los cromosomas a lo largo de toda la meiosis, así como los cinetocoros de espermatogonias y células somáticas adyacentes como epiteliales, células de Leydig y células de Sertoli. Además, nuestros resultados demuestran que SYCP3 es una proteína que se expresa específicamente en meiosis, ya que no se detecta ni en células espermatogoniales en interfase o mitosis, ni en células de Sertoli o de Leydig.

### 1.1. Primera división meiótica

La proteína SYCP3 comienza a aparecer en espermátocitos al comienzo de la profase-I en leptotena. SYCP3 aparece como finas líneas discontinuas que se corresponden con los EAs en formación y que recorren el núcleo hasta alcanzar la EN. En esta etapa SYCP3 marca también los nucleolos (imágenes no mostradas). En cigotena, etapa en la cual los cromosomas homólogos comienzan a aparear, se aprecia que algunas señales de SYCP3 aparecen como filamentos gruesos, que se corresponden con zonas en las que ya se ha formado CS, y otras más finas que corresponden a ELs aún no apareados (Fig. 1 A). Los cinetocoros en leptotena y cigotena consisten en pequeñas señales discretas en cada centrómero. En algunas ocasiones puede apreciarse una conformación polarizada de los extremos cromosómicos proximales (centrómeros) en el núcleo durante la transición leptotena-cigotena. Esta disposición es un reflejo de la conformación en *bouquet* de los telómeros, en referencia a la disposición de los cromosomas semejante a un ramo de flores (*“bouquet”*: del francés ramillete) (Fig. 1 A-D). Se ha descrito que el apareamiento de los cromosomas homólogos, así como la posterior sinapsis, están favorecidos por esta conformación en *“bouquet”* de los telómeros (Scherthan y col., 1996; Scherthan, 2001). Observando los núcleos en cigotena, apreciamos que los cromosomas se encuentran anclados por sus extremos a la EN, y por tanto solamente encontramos señales cinetocóricas en los primeros y últimos planos de enfoque del núcleo, así como delimitando el volumen nuclear en los planos focales intermedios. En las imágenes mostradas aparecen señales cinetocóricas en toda la superficie del núcleo debido a que son proyecciones en el eje Z de las fotografías tomadas en los diferentes planos focales de un mismo núcleo (Fig. 1 A-D).

En paquitena, los CSs de los bivalentes autosómicos, ya totalmente formados, se observan como líneas onduladas que recorren el núcleo y cuyos extremos contactan con la EN (Fig. 1 E-I). En la mayoría de las ocasiones observamos los dos ELs de cada bivalente como una única línea, pero a veces somos capaces de distinguir a gran aumento los dos ELs como dos líneas paralelas que giran a lo largo de los CSs (Fig. 1 H). El marcaje de los cinetocoros en esta etapa, los cuales siguen anclados a la EN, consiste en una discreta señal redondeada o ligeramente ovalada en el extremo de cada bivalente (Fig. 1 E-H). Asimismo, se observa un engrosamiento de los extremos de cada EL que se corresponde con las placas de asociación a la EN (Fig. 1 E y H). En el interior del cuerpo sexual (XY) se visualizan, como líneas más delgadas, los EAs no

sinapsados de los cromosomas sexuales y los ELs sinapsados de la región PAR, y se distinguen dos señales cinetocóricas que corresponden a los cromosomas X e Y respectivamente (Fig. 1 G e I). En diplotena, observamos líneas finas que se corresponden con los dos ELs separados allí donde los homólogos se han desinapsado y líneas más gruesas en aquellos lugares donde los ELs siguen sinapsados (Fig. 1 J-N). En esta fase los cinetocoros aparecen como una única señal redondeada en el extremo de cada bivalente, y en aquellos casos en los que se haya producido ya la desinapsis entre los cromosomas homólogos por las regiones centroméricas podrán observarse dos señales individualizadas, una por cada cromosoma homólogo (Fig. 1 K-N). La vesícula sexual ya no aparece en la periferia nuclear, sino que se ha internalizado en el núcleo, y en su interior se distinguen como líneas delgadas los EAs no sinapsados y los ELs de la región PAR del XY, (Fig. 1 N). Además, en esta etapa continúan observándose las placas de asociación de los ELs a la EN (Fig. 1 M) (Videos 1 y 2 en material suplementario). Durante paquitena y diplotena la fluorescencia mostrada por SYCP3 en el nucleoplasma es bastante baja, sin embargo, en diacinesis se aprecia un aumento significativo de la misma. En esta etapa, los ELs desinapsados marcados con SYCP3 apenas son visibles ya que el nucleoplasma está intensamente marcado, aunque sí se detectan pequeños engrosamientos a lo largo de los mismos, así como grandes y brillantes acumulaciones de SYCP3 en el nucleoplasma (Fig. 1 O-S). En diacinesis los cromosomas ya se han soltado de la EN y por lo tanto podemos observar las señales centroméricas en todos los planos dentro del volumen del núcleo que enmarca la todavía existente EN (Fig. 1 O-S).



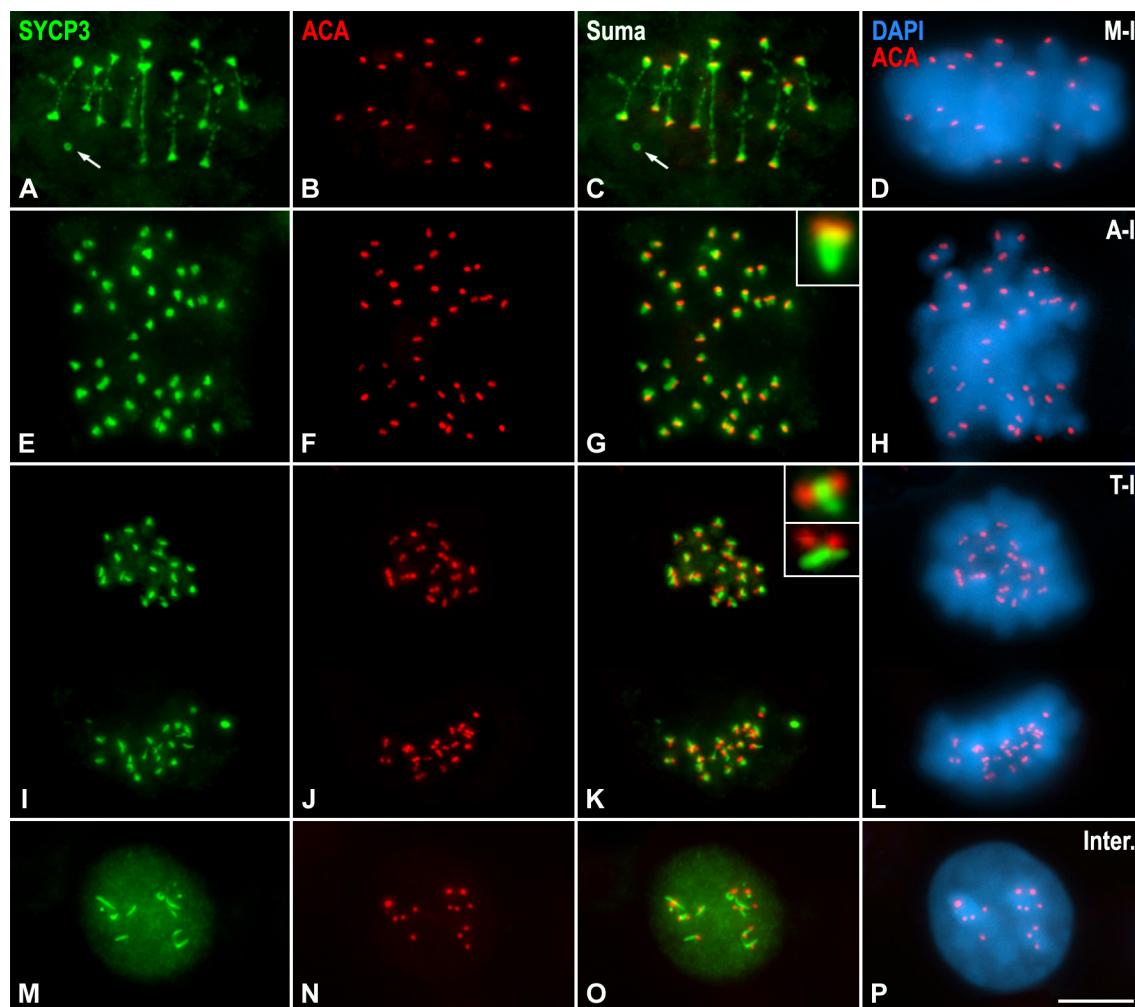
**Figura 1.** Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) sobre espermatoцитos aplastados en diferentes etapas de la profase-I. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Cigotena. SYCP3 marca los EAs asinapsados y los ELs sinapsados del CS. Los cinetocoros aparecen como pequeñas señales discretas. Las flechas en B, C y D indican la conformación en “bouquet” de los extremos cromosómicos y la consecuente polarización de las señales de los cinetocoros en una determinada región del núcleo. (E-I) Paquitena. SYCP3 marca los ELs sinapsados de los bivalentes autosómicos y los EAs del bivalente sexual (XY). Las flechas en H indican los dos ELs del CS del bivalente autosómico seleccionado. (J-N) Diplotena. SYCP3 marca los ELs sinapsados y desinapsados de los bivalentes autosómicos y los EAs del bivalente sexual (XY). Las flechas en M indican los ELs desinapsados del bivalente autosómico seleccionado. (O-S) Diacinesis. SYCP3 marca los ELs desinapsados sobre los que aparecen intensos engrosamientos. Las flechas en O, Q y R indican los engrosamientos de los ELs desinapsados. (H, M y R) Las cabezas de flecha blancas indican los engrosamientos distales de cada EL que se corresponden con las placas de asociación a la EN en las diferentes etapas. Las cabezas de flecha azules indican las regiones centroméricas de los bivalentes autosómicos seleccionados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en S representa 5  $\mu$ m.



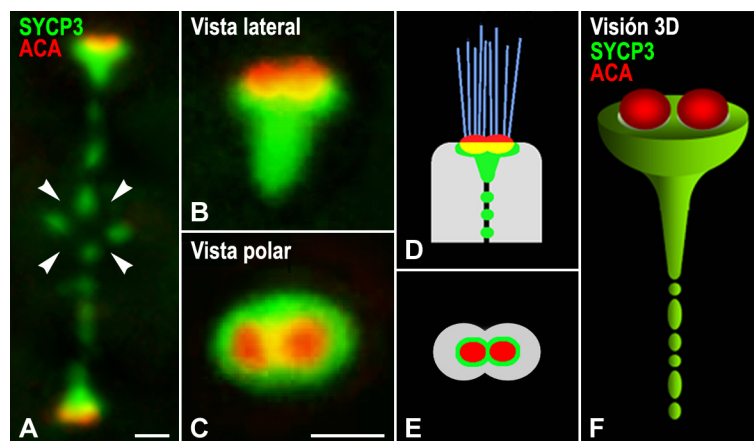
Durante la prometafase-I y la metafase-I la intensidad de la fluorescencia en el citoplasma se ve fuertemente reducida, pudiéndose discernir claramente una intensa señal de SYCP3 en la región centromérica así como en la superficie de contacto entre las cromátidas hermanas de los bivalentes, el denominado de ahora en adelante dominio intercromatídico (Fig. 2 A-D). El marcaje en el dominio intercromatídico de los bivalentes autosómicos se observa como discretos parches o líneas discontinuas y está presente desde los centrómeros hasta el punto de quiasma, donde siempre se interrumpe, y desde el punto de quiasma hasta los telómeros distales (Fig. 3 A). SYCP3 también se localiza en el dominio intercromatídico del bivalente sexual apareciendo siempre como una señal más intensa y continua que la que aparece en los bivalentes autosómicos (datos no mostrados). Además, persisten aún acúmulos de SYCP3, que tras la rotura de la EN, se encuentran dispersos en el citoplasma (Fig. 2 A, C). Los cinetocoros aparecen como una única señal por cromosoma homólogo o como dos señales muy juntas, una por cada cinetocoro hermano (Fig. 2 B-D). En un análisis más detallado del centrómero en metafase-I observamos que el marcaje centromérico de SYCP3 aparece en forma de “T” o “Y” en visión lateral con todos los sueros utilizados para reconocer la proteína (Fig. 2 A-D y Fig. 3 A, B). La visión lateral de los centrómeros permite apreciar que SYCP3 está localizada justo bajo la señales cinetocóricas y que ambas señales colocalizan parcialmente (Fig. 3 B). Cuando se tiene una visión polar de los centrómeros se aprecian dos anillos de SYCP3 unidos entre sí, los cuales rodean a las señales cinetocóricas (Fig. 3 C). Al observar en conjunto las visiones laterales y polares de la doble inmunodetección de SYCP3 y los cinetocoros, visualizamos que la señal de SYCP3 junto con las de los cinetocoros hermanos adquiere una conformación que recuerda a un “cucurucho de dos bolas de helado”, en la cual la señal de SYCP3 sería el “barquillo” y cada uno de los dos cinetocoros sería cada una de las “dos bolas de helado”. Debido a esta apariencia tan característica denominaremos a esta conformación de SYCP3 en los centrómeros de metafase-I como dominio en “doble cornete” (Fig. 3 D-F) (Vídeo 3 en material suplementario).

En anafase-I la señal de SYCP3 en los brazos cromosómicos deja de ser detectada, pero aún persiste la presente en los centrómeros (Fig. 2 E-H). La señal centromérica de SYCP3 persiste aún a modo de “doble cornete” si bien los cinetocoros hermanos están ligeramente más separados (Fig. 2 F-H). En algunas ocasiones se siguen encontrando acúmulos de SYCP3 en el citoplasma. Durante la telofase-I los cinetocoros hermanos

aparecen más separados que durante la anafase-I, ya que es en esta transición cuando se produce la pérdida de la cohesión intercinetocórica (Fig. 2 I-L). Además, es en telofase I cuando SYCP3 deja de adoptar una estructura a modo de “doble cornete” en los centrómeros para pasar a observarse como pequeñas barras que pueden estar en medio de los cinetocoros hermanos ya individualizados o ligeramente separados de los mismos (detalles en Fig. 2 K) (Vídeo 4 en material suplementario).



**Figura 2.** Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) sobre espermatocitos aplastados durante la primera división meiótica y en intercinesis. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Metafase-I. SYCP3 marca una señal centromérica en forma de “T” bajo cada pareja de cinetocoros hermanos íntimamente asociados, y una señal parcheada a lo largo del dominio intercromatídico. Las flechas en A y C indican aglomerados citoplasmáticos de SYCP3. (E-H) Anafase-I. SYCP3 persiste como una señal en forma de “T” en los centrómeros, mientras que se ha perdido la señal de los brazos. El detalle en G muestra a mayor aumento la visión lateral de una de las regiones centroméricas de un bivalente autosómico. (I-L) Telofase-I. SYCP3 cambia su conformación y aparece como barras que se localizan cercanas a los cinetocoros hermanos individualizados. Los detalles en K muestran a mayor aumento las señales con forma de barras de SYCP3, que pueden aparecer entre los cinetocoros hermanos individualizados o ligeramente separados de los mismos. (M-P) Intercinesis. Las señales de SYCP3 con forma de barra se localizan cercanas a las señales cinetocóricas sobre los cromocentros. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.



**Figura 3.** Detalles de la doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en un bivalente autosómico seleccionado en metafase-I (A) y de las visiones lateral y frontal de las regiones centroméricas (B, C). (A) SYCP3 marca el dominio intercromatídico con una señal a modo de parches y el dominio centromérico interno con la característica forma de "T". Las cabezas de flecha indican la región del quiasma. (B) La visión lateral muestra el marcaje de SYCP3 con forma de "T". (C) La visión polar muestra el marcaje de SYCP3 a modo de doble anillo que abraza a los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. Se incluye la representación esquemática de las señales centroméricas mostradas (B, C) en un esquema de la visión lateral (D), de la visión polar (E) y de la reconstrucción en 3D (F). La barra de medida en A representa 1  $\mu\text{m}$  y la barra en B (B, C) representa 1  $\mu\text{m}$ .

## 1.2. Segunda división meiótica

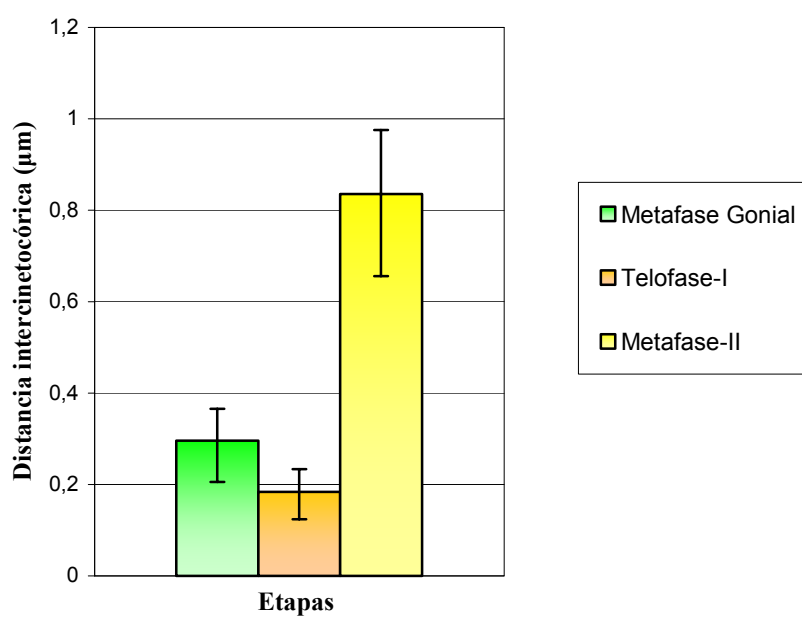
En los núcleos en intercinesis SYCP3 sigue apareciendo como pequeñas barras que se encuentran ligeramente apartadas de los cinetocoros hermanos, los cuales se localizan congregados en los cromocentros (Fig. 2 M-P). Es difícil contar el número de señales cinetocóricas que aparecen en intercinesis puesto que es muy variable en cada célula. Esto probablemente se deba a que los centrómeros se encuentran agrupados en los cromocentros y las señales se encuentran muy juntas como para poder distinguir unas de otras.

Se ha descrito previamente la persistencia de SYCP3 en los centrómeros de cromosomas en metafase-II en espermatocitos esparcidos de ratón (Moens y Spyropoulos, 1995; Revenkova y col., 2001). Sin embargo, nosotros no hemos encontrado ningún marcaje de SYCP3 ni en los cromosomas ni en el citoplasma desde la intercinesis hasta la anafase-II. No obstante, SYCP3 vuelve a ser detectada en los núcleos en telofase-II como pequeñas señales difusas en las regiones centroméricas y también en las colas de las espermátidas redondas tempranas. Más adelante, este leve marcaje centromérico de SYCP3 vuelve a desaparecer y no se detecta en espermátidas alargadas (imágenes no mostradas).

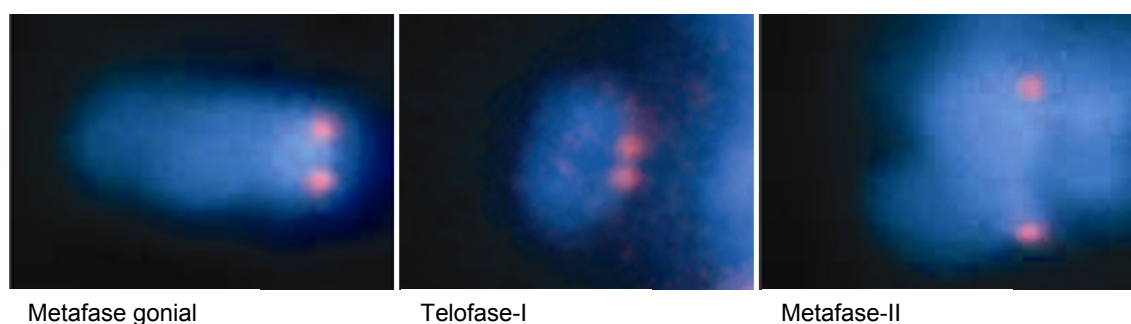
Debido a que a diferencia de otros autores nosotros no encontramos ningún marcaje de SYCP3 en metafase-II decidimos hacer un conteo de las señales cinetocóricas en las diferentes etapas de la meiosis con objeto de asegurar verazmente la etapa observada en cada momento. Aunque ya ha sido comentado con anterioridad, conviene recalcar en este punto que con la técnica de aplastado podemos identificar sin confusión la etapa en la que se encuentran las células ya que se mantienen intactos el volumen celular y la organización cromosómica. De este modo, al realizar la inmunodetección con sueros anticentrómero podemos contar en metafase-II veinte pares de cinetocoros hermanos que, debido a la tensión ejercida por el huso, se encuentran bien separados entre sí, a diferencia de las metafases espermatogoniales en las que aparecen cuarenta pares de cinetocoros hermanos muy juntos entre sí. De esta forma, al realizar dobles inmunodetecciones de SYCP3 y cinetocoros, pudimos corroborar que aquellas etapas en las que no se observa marcaje de SYCP3 corresponden a metafases espermatogoniales en el caso de encontrar cuarenta pares de cinetocoros muy juntos entre sí y a metafases-II cuando se observan veinte pares de cinetocoros hermanos bien separados (imágenes no mostradas).

Además, ya que hemos usado como marcaje de referencia los sueros anticentrómero en casi todas las inmunodetecciones que se presentan en esta memoria de Tesis Doctoral, hemos realizado medidas de las distancias entre cinetocoros hermanos en metafase espermatogonial, telofase-I y metafase-II, siendo éstas de media 0,29  $\mu\text{m}$ , 0,18  $\mu\text{m}$  y 0,83  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Tabla y Gráfico 4). De esta forma, tenemos una excelente herramienta para analizar los resultados obtenidos tras las dobles inmunodetecciones de cinetocoros junto con las diferentes proteínas que se van a estudiar de manera que podamos diferenciar sin error las etapas de la meiosis en espermátocitos aplastados de ratón, y asegurarnos así, en caso de existir dudas, de si se trata bien de una metafase espermatogonial, un polo de telofase-I o una metafase-II. Para esta prueba es importante destacar que se ha tomado un número suficientemente grande de muestra para todas las fases estudiadas (N=40) y que la desviación típica para cada caso no supera nunca el 15%. Los datos recopilados en la Tabla y Gráfico 4 nos servirán también para analizar los resultados de inmunolocalización de diversas proteínas que se expondrán en apartados posteriores (Tabla y Gráfico 4 e Imagen 2).

Etapas	Media	Máximo valor	Mínimo valor	N = Tamaño de muestra
Metafase gonial	$0.29 \pm 0.038$	0,36	0,2	40
Telofase-I	$0,18 \pm 0,027$	0,23	0,13	40
Metafase-II	$0,83 \pm 0,082$	0,97	0,65	40



**Tabla y Gráfico 4.** Medida de distancias intercinetocóricas en metafase espermatogonial, telofase-I y metafase-II.



**Imagen 2.** Inmunolocalización de las señales cinetocóricas (rojo) en metafase gonial, telofase-I y metafase-II en espermatocitos aplastados de ratón. La contratinción de la cromatina se ha realizado con DAPI (azul).

## **2. Localización de las cohesinas en la meiosis de ratón**

La distribución de las cohesinas REC8, RAD21 SMC3 y STAG3 se han analizado en aplastados de túbulos seminíferos de ratón, probando al menos dos anticuerpos diferentes contra cada proteína estudiada (ver Tabla 2 en Material y Métodos).

Es importante comentar que con el fin de completar los resultados sobre la distribución y dinámica de las cohesinas, se hicieron diversas pruebas de inmunodetección de las cohesinas SMC1 $\alpha$ , SMC1 $\beta$  y SA2 con los anticuerpos que se detallan en el apartado de Material y Métodos, pero ninguno de los anticuerpos utilizados rindió resultados positivos.

### **2.1. Distribución de REC8**

Para comprobar los resultados previamente publicados sobre la distribución de REC8 en esparcidos de espermátocitos de rata (Eijpe y col., 2003) y ratón (Lee y col., 2003), hemos realizado su inmunodetección probando varios anticuerpos diferentes (ver Tabla 2 en Material y Métodos) en espermátocitos aplastados de ratón. Las imágenes mostradas corresponden únicamente al suero anti-mREC8 amablemente cedido por el Dr. Jibak Lee (Lee y col., 2003), ya que el resto de anticuerpos testados no rindieron reacciones positivas.

#### **2.1.1. Primera división meiótica**

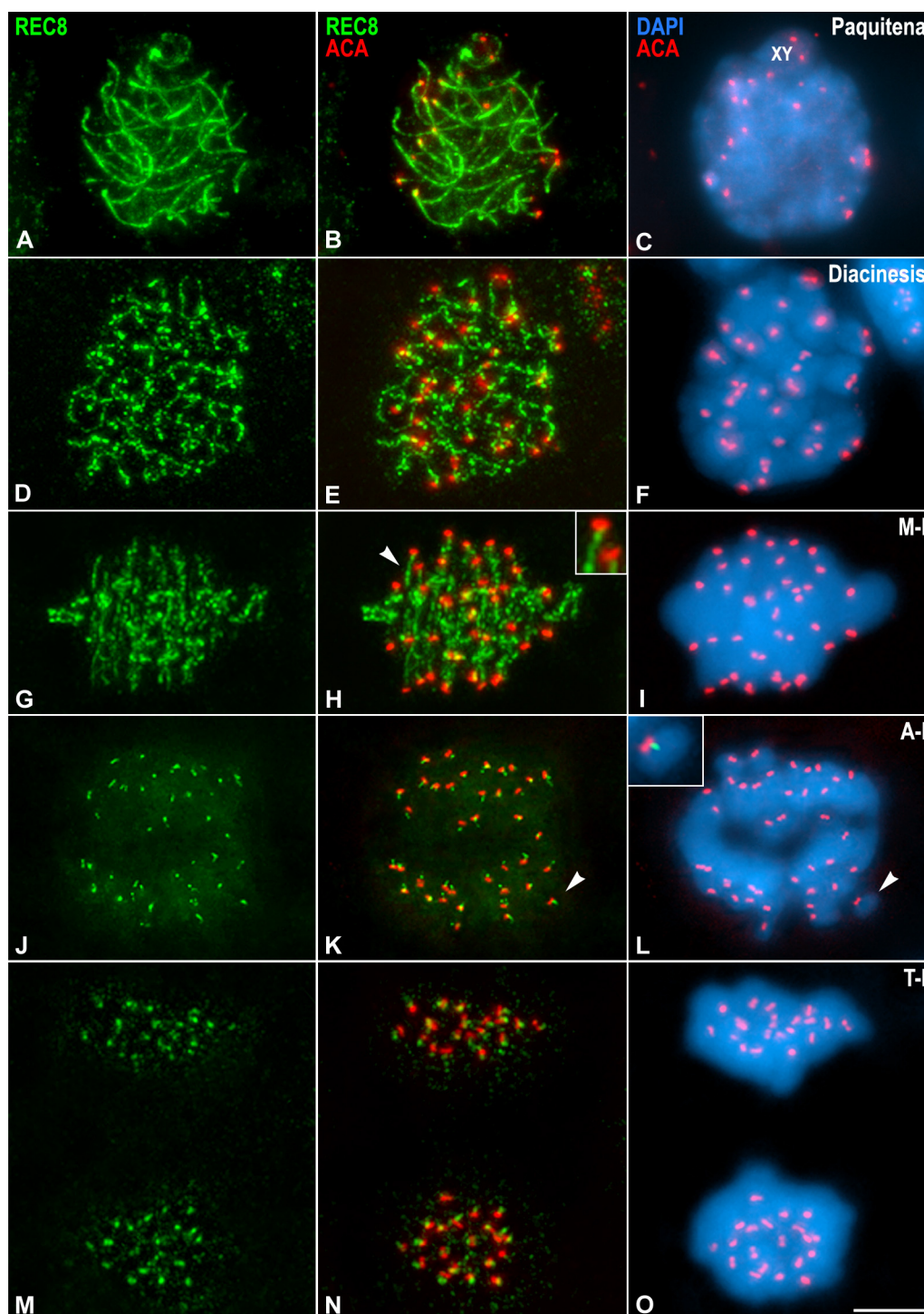
Ya que el eje de cohesina subyace a los EAs y ELs del CS (Yuan y col., 1998), cualquier proteína localizada en dicho eje tendrá el mismo patrón de localización que las proteínas de los EAs/ELs. A partir de ahora, y para todas las cohesinas analizadas, referiremos su localización a EA o EL del CS, aunque en realidad se localicen en el eje de cohesina.

REC8 es una cohesina específicamente meiótica y por lo tanto no aparece ningún marcaje de la misma en las células espermátogoniales (imágenes no mostradas). Durante la profase-I meiótica, REC8 se localiza lo largo de los EAs/ELs del CS marcando finas líneas punteadas que corresponden a los EAs en leptotena y a los EAs y ELs en formación en cigotena (imágenes no mostradas). En paquitena, REC8 marca los ELs de los autosomas como líneas onduladas discontinuas que recorren el núcleo y cuyos extremos contactan con la EN, así como los EAs del bivalente sexual y los ELs de la región PAR del mismo (Fig. 4 A-C). A diferencia de lo comentado anteriormente

para SYCP3, con el marcaje de REC8 no se observa ningún engrosamiento en los extremos cromosómicos, ni ningún marcaje de las placas de asociación (Fig. 4 A-C). En diplotena, REC8 marca los ELs desinapsados como líneas punteadas que siguen ancladas por sus extremos a la EN (imágenes no mostradas). En diacinesis, REC8 aparece como una sucesión lineal de parches sobre los ELs desinapsados (Fig. 4 D-F) (Vídeo 5 en material suplementario). En los bivalentes autosómicos en metafase-I, REC8 aparece como parches brillantes a lo largo del dominio intercromatídico, que se interrumpen en las zonas de quiasma, y que también parecen ocupar parte del dominio centromérico (Fig. 4 G-I y Fig. 5 A). Para comprobar si REC8 está presente en el dominio centromérico, realizamos una doble inmunolocalización de REC8 y de los cinetocoros. En estas dobles inmunodetecciones vemos que en cromosomas condensados en metafase-I, REC8 aparece justo por debajo de las señales de los cinetocoros hermanos que están íntimamente asociados, pero nunca colocaliza con ellos, ocupando así sólo una subregión del dominio centromérico interno (Fig. 4 G-I y Fig. 5 A) (Vídeos 6 y 7 en material suplementario). Es interesante destacar que la señal intercromatídica de REC8 presente en el bivalente XY es más intensa y continua que la encontrada en los bivalentes autosómicos (comparar Fig. 5 A, B). Por otro lado, un examen detallado de la señal intercromatídica en el bivalente XY nos permitió distinguir que la señal flanqueando el único quiasma distal es significativamente mayor y más brillante que el resto de señal a lo largo de los brazos de ambos cromosomas (ver cabeza de flecha en Fig. 5 B). La señal de REC8 en el dominio intercromatídico que se aprecia en los bivalentes autosómicos y sexual se observa también en los univalentes sexuales que aparecen ocasionalmente en las metafases-I (Fig. 5 C, D). Al contrario de lo que ocurre con SYCP3 y RAD21 (que se describirá más adelante), nunca hemos encontrado acumulaciones de REC8 ni en el nucleoplasma de espermátocitos en diacinesis, ni en el citoplasma de células en metafase-I (Fig. 4 G-I). En anafase-I se pierde la cohesión braquial para permitir la correcta segregación de los cromosomas homólogos recombinados a polos opuestos de la célula. Mediante la inmunodetección de la cohesina REC8 podemos observar este fenómeno como la pérdida de la señal intercromatídica de REC8 en la transición metafase-I/anafase-I (Fig. 4 J-L). Sin embargo, la cohesión centromérica persiste en anafase-I y podemos observar una pequeña señal de REC8 con forma de coma por debajo de cada par de cinetocoros hermanos íntimamente asociados (Fig. 4 J-L; detalle en Fig. 4 L). Estas mismas señales

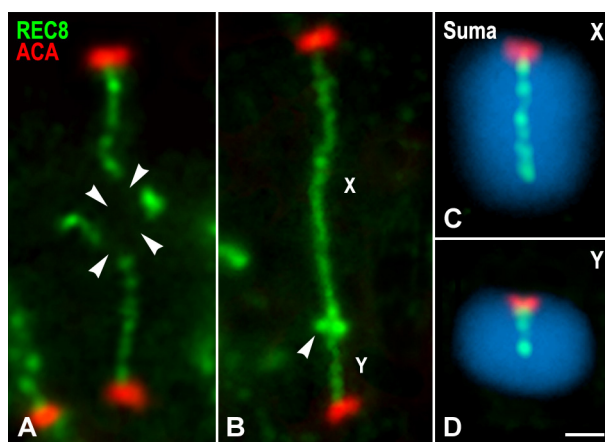


de REC8 en forma de coma persisten en telofase-I temprana (Fig. 4 M-O), y es ya en telofase-I tardía cuando las señales comienzan a aparecer más difusas (imágenes no mostradas). En telofase-I tardía las señales de los cinetocoros hermanos aparecen ligeramente más separadas que en metafase-I (Fig. 4 N, O), lo cual representa citológicamente la pérdida de cohesión intercinetocórica (Vídeo 7 en material suplementario).





◀ **Figura 4.** Doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) sobre espermatocitos aplastados durante la primera división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-F) Paquitena y diacinesis. REC8 aparece como una señal parcheada a lo largo de los EAs y ELs del CS. El bivalente sexual aparece indicado (XY). (G-I) Metafase-I. REC8 se localiza a lo largo del dominio intercromatídico de todos los bivalentes. La cabeza de flecha en H indica el marcaje de REC8 entre los brazos de las cromátidas hermanas. El detalle muestra la distribución de REC8 en la región centromérica, la cual no colocaliza con las señales de los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. (J-L) Anafase-I. REC8 aparece como pequeñas señales en forma de coma entre las parejas de cinetocoros hermanos. Las cabezas de flecha en K y L indican un cromosoma homólogo segregando a uno de los polos de la anafase-I, que se muestra a mayor aumento en el detalle en L. (M-O) Telofase-I. REC8 persiste en los centrómeros como señales en forma de coma que progresivamente van haciéndose más difusas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en O representa 5  $\mu$ m.



**Figura 5.** Detalles de la doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en un bivalente autosómico seleccionado en metafase-I (A), así como en un bivalente sexual (B) y en univalentes X e Y (C, D). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A) REC8 marca el dominio intercromatídico del bivalente autosómico con una señal a modo de parches con una pequeña señal que llega hasta justo debajo de los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. Las cabezas de flecha indican la región del quiasma. (B) REC8 marca el dominio intercromatídico del bivalente XY con una señal a modo de parches que llega hasta justo los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. La cabeza de flecha indica la señal de REC8 flanqueando el quiasma. (C, D) REC8 marca el dominio intercromatídico de los univalentes X e Y. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 1  $\mu$ m.

### 2.1.2. Segunda división meiótica

Cuando realizamos inmunodetecciones con un suero anti-mREC8 sobre aplastados de túbulos seminíferos de ratón nunca hemos llegado a detectar señales de REC8 en intercinesis, ni tampoco en profase-II ni en metafase-II (Fig. 6 A, B). Debido a que existían contradicciones entre los resultados que nosotros habíamos obtenido con el suero anti-mREC8 del que disponíamos y las publicaciones de otros grupos de investigación en los que sí detectan REC8 en la segunda división meiótica (Kudo y col., 2006), procedimos a solicitar al Dr. Kim Nasmyth del Departamento de Bioquímica de

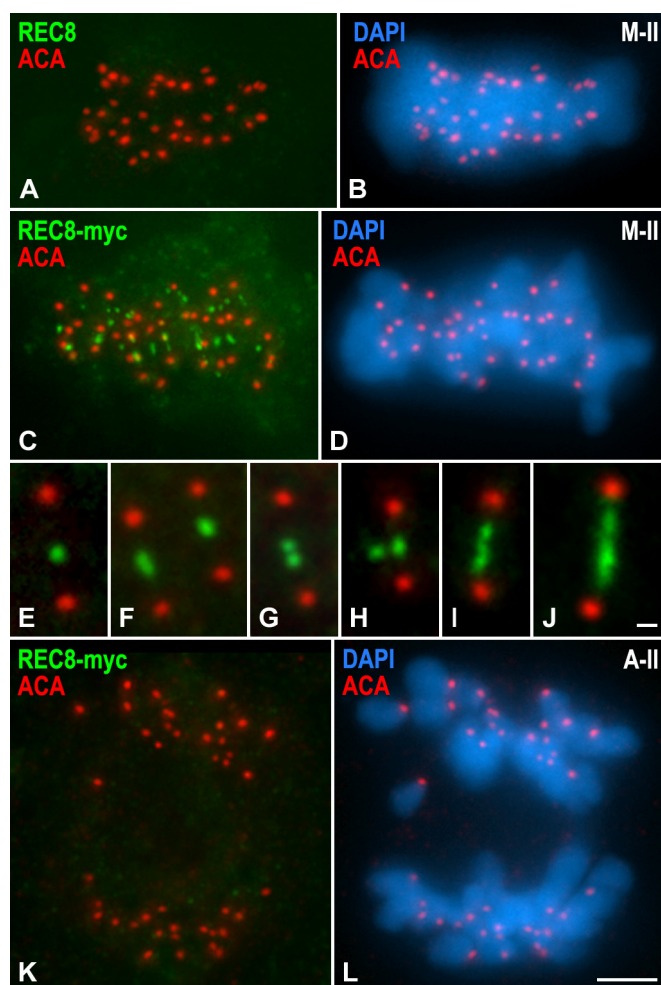
la Universidad de Oxford el envío de individuos de ratón transgénicos portadores de un fragmento *myc* acoplado a REC8. En estos ratones el fragmento *myc* que está acoplado a REC8 puede detectarse con anticuerpos secundarios anti-*myc* con los que indirectamente se puede observar la señal de REC8. El Dr. Nasmyth envió generosamente dos individuos macho REC8-*myc* en los que tras ser analizados, sí pudimos detectar señales de REC8 en espermatocitos en intercinesis y profase-II (imágenes no mostradas) y en metafase-II (Fig. 6 C, D). En intercinesis pudimos observar como REC8 aparece como un leve punteado en todo el volumen del núcleo que se intensifica en las regiones correspondientes a los cromocentros (imágenes no mostradas). En profase-II comienzan a aparecer pequeñas señales de REC8 en las regiones centroméricas (imágenes no mostradas). Las señales de REC8 en metafase-II consisten en pequeños puntos discretos entre los cinetocoros hermanos a nivel del dominio centromérico interno. Estos puntos pueden ser sencillos o dobles y en este último caso pueden estar orientado paralelos o perpendicularmente al eje intercinetocórico (Fig. 6 E-H). En algunos cromosomas, pero menos frecuentemente, también pudimos encontrar una señal en forma de barra que conectaba casi o totalmente los cinetocoros hermanos (Fig. 6 I-J). Tras la pérdida de cohesión centromérica en la transición metafase-II/anafase-II y la consecuente segregación de cromátidas a polos opuestos, se pierde la señal centromérica de REC8 (Fig. 6 K-L) la cual ya no vuelve tampoco a ser detectada ni en telofase-II ni en los diferentes estadios de la espermiogénesis (imágenes no mostradas).

## **2.2. Distribución de RAD21**

Para estudiar la distribución de la cohesina RAD21 se han probado siete anticuerpos diferentes (ver Tabla 2), pero únicamente con tres de ellos se obtuvieron idénticos resultados positivos. Las imágenes mostradas corresponden al suero K854 amablemente cedido por el Dr. José Luis Barbero (Prieto y col., 2002).

### **2.2.1. Primera división meiótica**

Aunque RAD21 es una cohesina que no es específica de meiosis, nuestros resultados demuestran que RAD21 no se detecta ni en células espermatozonales en interfase o mitosis (Fig. 7 A, B), ni en células de Sertoli o de Leydig (imágenes no mostradas).



**Figura 6.** Doble inmunolocalización de REC8 o REC8-myc (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) sobre espermatocitos aplastados durante la segunda división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) Metafase-II. No puede detectarse ninguna señal de REC8 en el centrómero utilizando el anticuerpo. (C, D) Metafase-II. REC8-myc aparece en las regiones centroméricas como un punto, dos puntos o una barra localizados entre los cinetocoros hermanos. (E-J) Detalles a gran aumento de varios centrómeros seleccionados en metafase-II. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L (A-D y K, L) representa 5  $\mu$ m y la barra en E (E-J) representa 0,5  $\mu$ m.

Hemos encontrado que, tal y como propusieron Parra y col. (2004), la distribución de RAD21 es idéntica a la encontrada para SYCP3 en cromosomas meióticos de ratón. Es necesario comentar que para la doble inmunolocalización de RAD21 y cinetocoros sólo se muestran las imágenes de las etapas más significativas, ya que más adelante se hará un análisis más detallado etapa a etapa para la doble inmunolocalización de RAD21 y REC8 (ver apartado 2.3).

Tras realizar la doble inmunolocalización de la cohesina RAD21 y los cinetocoros comprobamos que RAD21 comienza a ser detectada en los espermatocitos en leptotena como finas líneas que recorren el núcleo y alcanzan la EN que se corresponden con los EAs. En cigotena, etapa en la cual los cromosomas homólogos comienzan a aparear, se aprecia que algunas señales de RAD21 aparecen como filamentos gruesos, que se corresponden con zonas en las que se ha formado CS, y otras más finas que corresponden a EAs aún no sinapsados. Durante paquitena, momento en el cual se ha

completado la sinapsis, RAD21 marca los ELs del CS en los bivalentes autosómicos, y los EAs no sinapsados de los cromosomas sexuales (Fig. 7 A, B). En los extremos de los ELs anclados a la EN se observa unos engrosamientos que se corresponden con las placas de asociación (Fig. 7 A, B). En diplotena, RAD21 marca los dos ELs separados allí donde los homólogos han desinapsado. Durante diplotena tardía y diacinesis se aprecian algunos engrosamientos de RAD21 sobre los ELs desinapsados acompañados de un intenso aumento de la fluorescencia en el nucleoplasma. Además, en diacinesis comienzan a aparecer grandes y brillantes acumulaciones de RAD21 en el nucleoplasma. En prometafase-I, la intensidad de la fluorescencia en el citoplasma se reduce bruscamente acompañando a la rotura de la EN, y se aprecian claramente los acúmulos citoplásmicos de RAD21. En bivalentes en prometafase-I, RAD21 se localiza preferencialmente en el centrómero, y además de forma más tenue en el dominio intercromatídico.

La distribución de RAD21 en metafase-I es comparable a la encontrada en prometafase-I. En metafase-I también se ven acúmulos de RAD21 en el citoplasma (Fig. 7 C). En los bivalentes RAD21 se localiza preferencialmente en el centrómero por debajo de los cinetocoros hermanos íntimamente asociados y colocalizando parcialmente con ellos (Fig. 7 C, D y 8 A). Este marcaje de RAD21 en el dominio centromérico interno presenta forma de “doble cornete” tal y como se ha descrito previamente para SYCP3 (Parra y col., 2004). Este marcaje consiste en una estructura en forma de “T” en visiones laterales y que adquiere una forma de doble anillo rodeando a los cinetocoros hermanos en visión polar. Por otro lado, RAD21 aparece como una serie de parches tenues a lo largo del dominio intercromatídico, que abarca desde los centrómeros hasta el punto de quiasma, donde siempre se interrumpe, y desde el punto de quiasma hasta los telómeros distales. El marcaje intercromatídico del bivalente sexual es siempre más intenso y continuo que el que aparece en los bivalentes autosómicos. Otra característica curiosa del marcaje en el bivalente XY consiste en que mientras que la señal centromérica del cromosoma X es bastante llamativa, la señal del centrómero del Y es difícilmente apreciable (Fig. 8 B). En algunas escasas ocasiones encontramos univalentes sexuales que, interesantemente, también presentan marcado el dominio intercromatídico (Fig. 8 C, D).

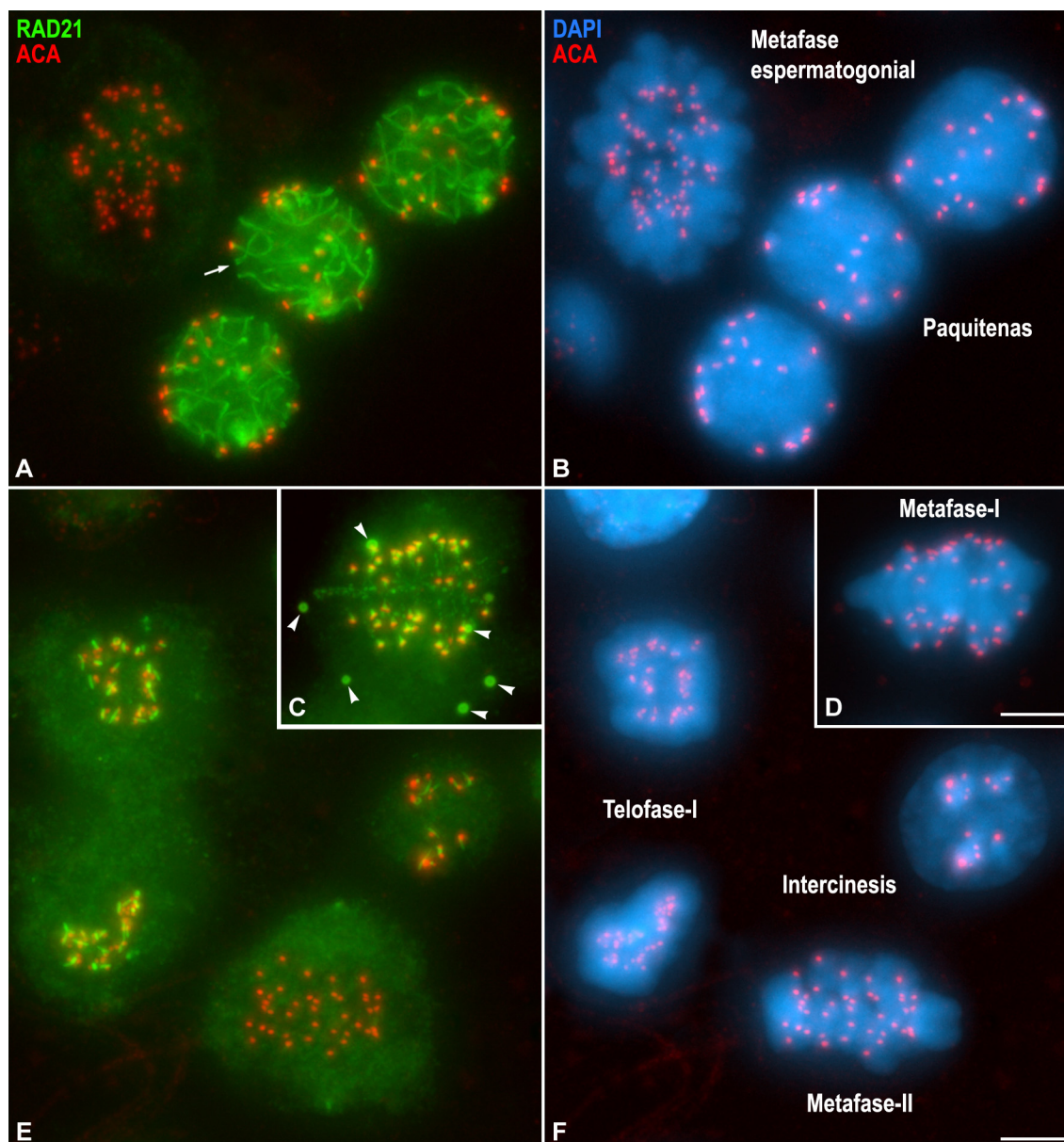
En anafase-I la señal de RAD21 en los brazos cromosómicos deja de ser detectada, puesto que la cohesión braquial se ha perdido, pero aún persiste el marcaje

centromérico en forma de “T” en visiones laterales. Durante la telofase-I RAD21 aparece en forma de pequeñas barras que pueden ser observadas en medio de los cinetocoros hermanos ya individualizados o ligeramente separadas de los mismos (Fig. 7 E, F).

### **2.2.2. Segunda división meiótica**

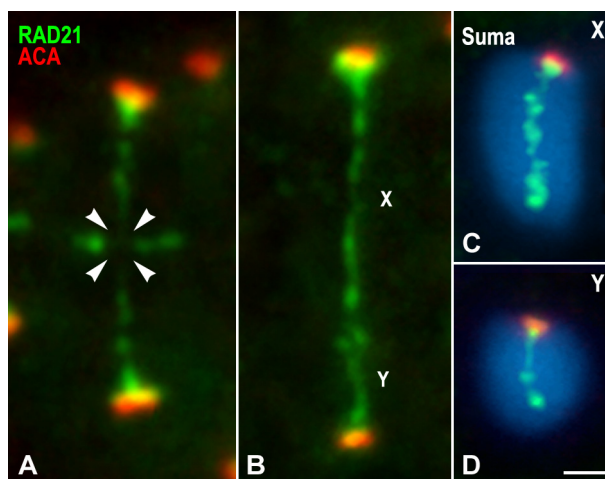
En intercinesis, las barras de RAD21 que veíamos en los centrómeros en telofase-I se siguen observando cerca de las señales cinetocóricas en los cromocentros (Fig. 7 E, F), si bien su número disminuye hasta llegar a desaparecer en espermatocitos en intercinesis tardía. La longitud de dichas barras varía dependiendo de la célula observada, del grado de condensación de la cromatina y de la distribución de los cromocentros, siendo en ocasiones más cortas y en otras más largas que las barras observadas en telofase-I.

Se ha descrito previamente la persistencia de RAD21 y SYCP3 en los centrómeros de cromosomas en metafase-II en espermatocitos esparcidos de ratón (Moens y Spyropoulos, 1995; Revenkova y col., 2001; Xu y col., 2004). Estos autores describían que tanto RAD21 (Xu y col., 2004) como SYCP3 (Moens y Spyropoulos, 1995; Revenkova y col., 2001; Xu y col., 2004) aparecen en metafase-II como pequeñas barritas cercanas a los cinetocoros hermanos. Sin embargo, nosotros no hemos podido observar ni en profase-II ni en metafase-II ningún tipo de marcaje de RAD21 ni en los cromosomas ni en el citoplasma con ninguno de los anticuerpos que hemos utilizado (Fig. 7 E, F). Pudimos comprobar que las células que clasificamos como espermatocitos en metafase-II correspondían a este estadio dado que en ellas contamos 20 parejas de señales cinetocóricas en las que la distancia apreciada entre los cinetocoros hermanos es del orden de 3 veces mayor que la apreciada entre cinetocoros hermanos en metafase espermatogonial o en telofase-I (Tabla y Gráfico 4). Nuestros resultados indican por tanto que, al igual que ocurre con SYCP3, RAD21 desaparece de los centrómeros de los cromosomas en intercinesis tardía y consecuentemente no está presente durante la segunda división meiótica de ratón.



**Figura 7.** Doble inmunolocalización de RAD21 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) sobre espermatocitos aplastados en diferentes etapas de la meiosis. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) RAD21 marca los ELs sinapsados en paquítena. La flecha en A indica los engrosamientos distales de los ELs que se corresponden con las placas de asociación a la EN. Puede observarse que no existe ningún marcaje de SYCP3 en la metafase espermatogonial (C, D) Metafase-I. RAD21 marca el dominio intercromatídico con una señal parcheada débil y la región centromérica con la característica forma de "T". Las cabezas de flecha en C indican los aglomerados de RAD21 del citoplasma. (E, F) En telofase-I RAD21 aparece como señales en forma de barras que se localizan entre las parejas de cinetocoros hermanos o ligeramente separadas de los mismos. En intercinesis persisten las barras de RAD21 en los cromocentros. No aparece ningún marcaje de RAD21 en metafase-II. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. Las barras de medida en D y F representan 5  $\mu\text{m}$ .





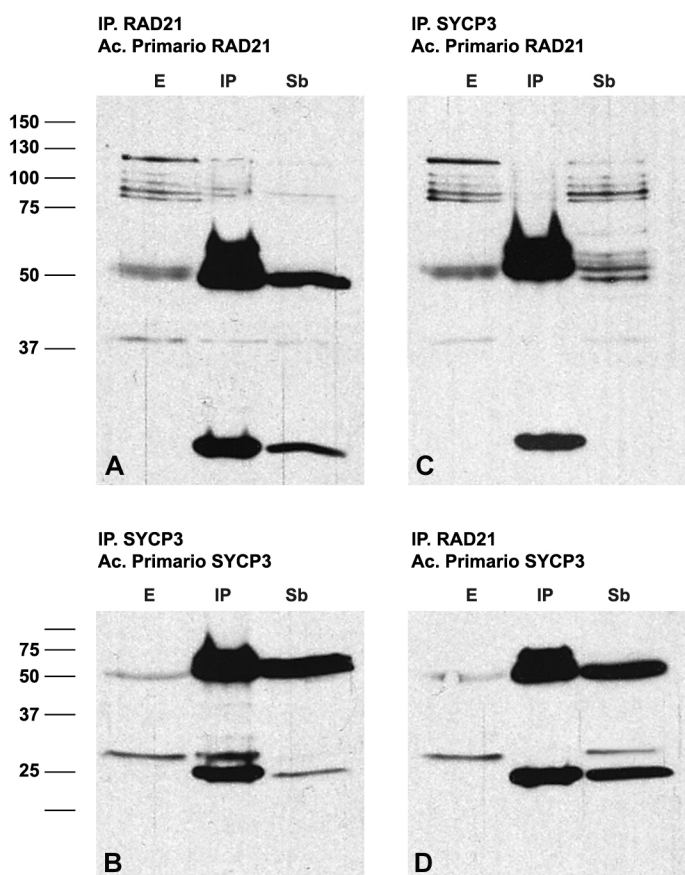
**Figura 8.** Detalles de la doble inmunolocalización de RAD21 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en un bivalente autosómico seleccionado en metafase-I (A), así como en un bivalente sexual (B) y en univalentes X e Y (C, D). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A) RAD21 marca el dominio intercromatídico con una señal a modo de parches y el dominio centromérico interno. Las cabezas de flecha indican la región del quiasma del bivalente autosómico seleccionado. (B-D) RAD21 marca el dominio intercromatídico con una señal a modo de parches y el dominio centromérico interno tanto en el bivalente XY como en los univalentes X e Y. Se puede observar que la señal centromérica de RAD21 es mayor en el cromosoma X que en el cromosoma Y. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 1  $\mu\text{m}$ .

Dado que detectamos que la cohesina RAD21 y la proteína SYCP3 del CS tienen el mismo patrón de localización a lo largo de la primera división meiótica, decidimos realizar la “*coimmunoprecipitación*” de ambas proteínas con objeto de averiguar si forman o no un complejo estable (Fig. 9).

Mediante la técnica de inmunoprecipitación/*Western Blot* realizada por separado para RAD21 y para SYCP3 pudimos observar como el anticuerpo contra RAD21 detecta el patrón característico de bandas de la proteína alrededor de 70-100 kDa tanto en el carril de *blot* del extracto proteico de testículo de ratón como en el inmunoprecipitado, pero no en el sobrenadante obtenido tras la precipitación (Fig. 9 A). Por otro lado, el anticuerpo contra SYCP3 detecta una banda de alrededor de 30 kDa (que corresponde con la movilidad de la proteína) tanto en el carril de *blot* del extracto proteico como en el inmunoprecipitado, pero tampoco se detecta en el sobrenadante obtenido tras la precipitación (Fig. 9 B). Sin embargo, cuando intentamos detectar RAD21 en el precipitado de SYCP3 no da resultado positivo en el mismo, pero sí en el extracto proteico y en el sobrenadante (Fig. 9 C), lo cual significa que, dado que ambas proteínas no forman complejo estable en el extracto, RAD21 no precipitó unida a SYCP3. Ocurre lo mismo en la situación opuesta, es decir, cuando intentamos detectar

SYCP3. Ocurre lo mismo en la situación opuesta, es decir, cuando intentamos detectar SYCP3 en el precipitado de RAD21 no obtenemos reacción positiva, pero sí podemos ver la banda de 30 kDa correspondiente a SYCP3 en el extracto y en el sobrenadante (Fig. 9 D). Además, como podemos ver en el revelado del *Western Blot* (Fig. 9), en este protocolo siempre detectaremos una banda de 50 kDa en el precipitado que se corresponde con la proteína A. Además, también encontramos bandas de alrededor de 25 kDa en el precipitado y en el sobrenadante, pero no en el extracto, que se corresponden con la fracción de inmunoglobulina del anticuerpo que se haya empleado en la inmunoprecipitación.

Con estos resultados comprobamos que sorprendentemente y según el protocolo seguido, ambas proteínas no coinmunoprecipitan, lo que significa que no forman un complejo estable. Sin embargo, como hemos demostrado tienen exactamente el mismo patrón de localización, lo que significa que están “en los mismos lugares y al mismo tiempo”, pero que probablemente no forman un complejo proteico estable, y en el caso de hacerlo, sería un débil complejo transitorio que se desensamblaría en el extracto durante el desarrollo de la técnica de inmunoprecipitación.



**Figura 9.** Coinmunoprecipitación recíproca de RAD21 y SYCP3. El carril E corresponde al extracto de testículo de ratón, el carril IP corresponde al inmunoprecipitado y el carril Sb corresponde al sobrenadante.

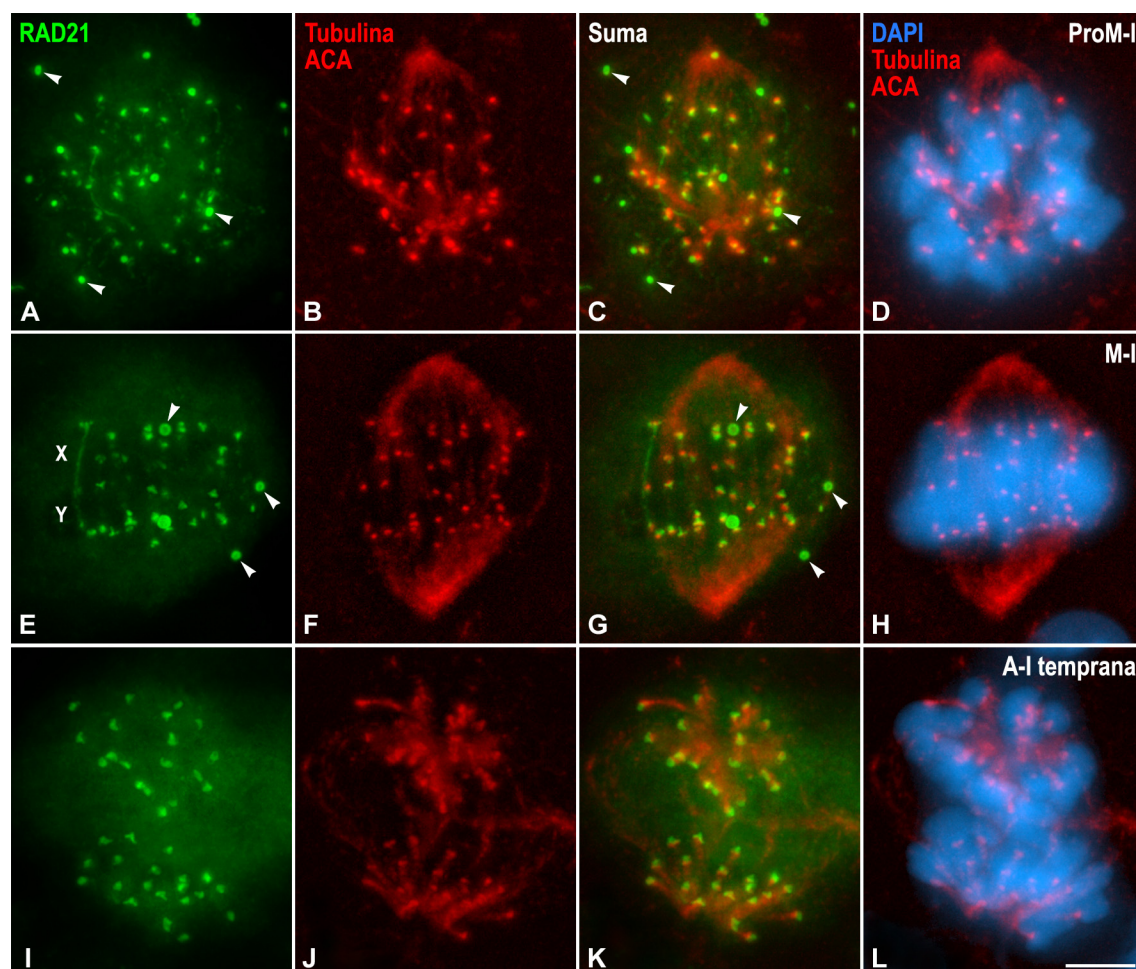


### 2.2.3. Identificación de las divisiones meióticas mediante marcaje de $\alpha$ -Tubulina

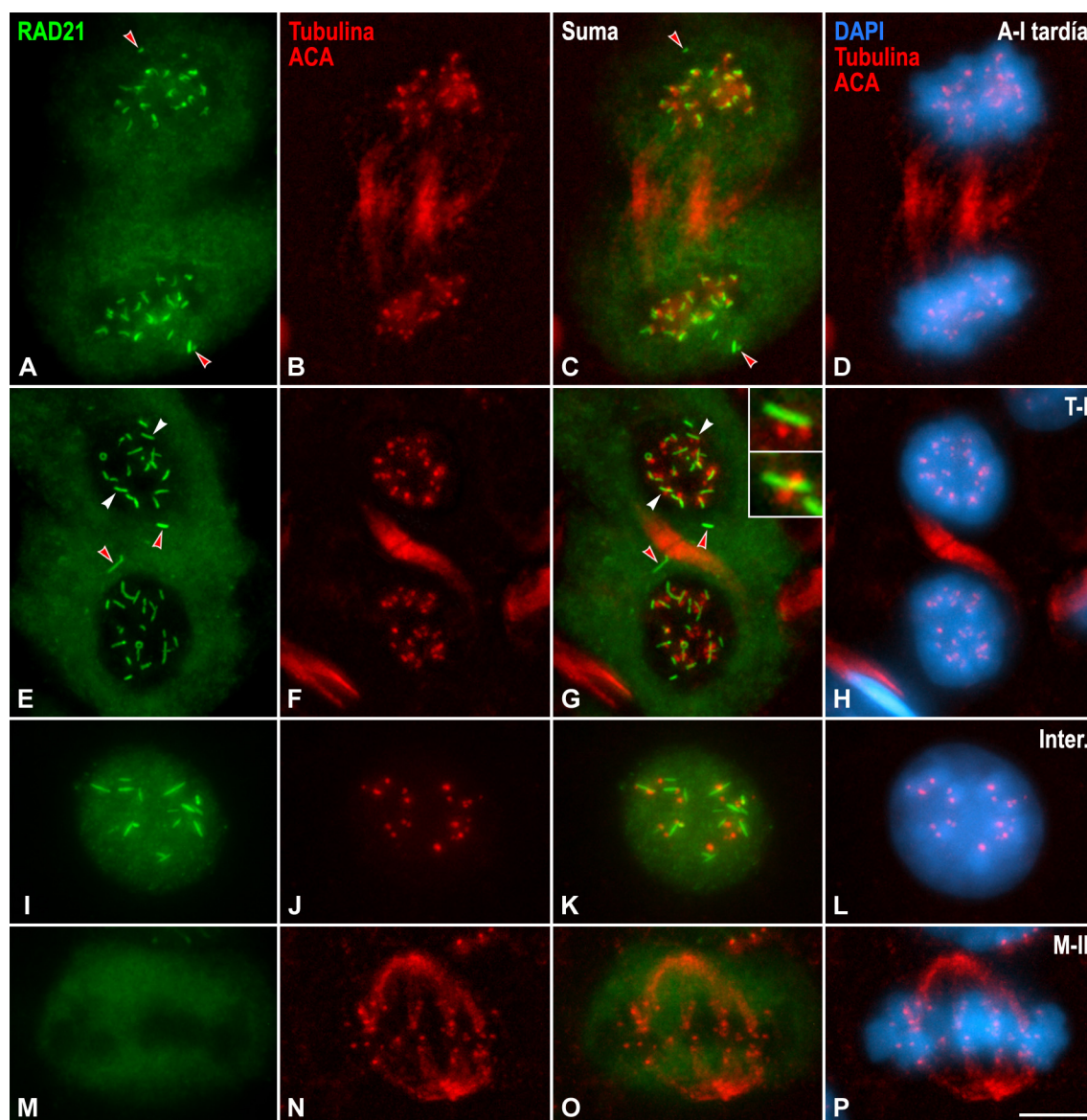
Con el propósito de tener otra prueba que identificara inequívocamente el tipo de división en que se encuentran las células observadas, y ya que como hemos dicho otros autores proponen que en concreto RAD21 persiste en los centrómeros de cromosomas en metafase-II (Xu y col., 2004), hicimos una triple inmunolocalización de la cohesina RAD21 junto con los cinetocoros y  $\alpha$ -Tubulina. Pudimos comprobar que durante prometafase-I, cuando los bivalentes se están anclando a MTs y sufriendo los movimientos de congregación con cada pareja de cinetocoros hermanos orientada sintéticamente, RAD21 marca el centrómero en forma de doble cornete y la región intercromatídica a modo de parches (Fig. 10 A-D). En metafase-I, cuando ya los veinte bivalentes se encuentran alineados en la placa ecuatorial, la señal de RAD21 se observa acumulada preferencialmente en los centrómeros y también débilmente en los brazos. En esta etapa podemos apreciar las fibras cinetocóricas provenientes de polos opuestos ancladas a los cinetocoros homólogos, los cuales son el resultado de la asociación íntima de los dos cinetocoros hermanos entre sí de manera que orienten de manera sintética. También podemos comprobar que el bivalente XY posee un marcaje más intenso en el dominio intercromatídico, y que aparecen acumulaciones de RAD21 en el citoplasma (Fig. 10 E-H). En anafase-I, cuando los homólogos recombinados migran a polos opuestos, observamos que la señal de RAD21 entre brazos se ha perdido, y que sólo persiste la señal centromérica (Fig. 10 I-L y 11 A-D). En telofase-I, los cromosomas homólogos ya han alcanzado los polos de forma que las fibras cinetocóricas dejan de observarse mientras que los MTs interzonales permanecen en el cuerpo medio del huso. En esta etapa, el marcaje centromérico de RAD21 comienza a cambiar de forma que se aprecia que las señales se han convertido en pequeñas barras que aparecen entre los cinetocoros hermanos o ligeramente separadas de ello (Fig. 11 E-H y detalles en G). Es más, observamos que los cinetocoros hermanos se individualizan separándose ligeramente, es decir, se pierde la cohesión intercinetocórica. En esta etapa diferenciamos claramente los MTs interzonales agregados en el cuerpo medio, el cual se hace cada vez más estrecho a medida que avanza la citocinesis (Fig. 11 E-H). En intercinesis, las barras de RAD21 son aún visibles, pero ya no observamos MTs (Fig. 11 I-L). Cuando los veinte cromosomas vuelven a alinearse en la placa ecuatorial en metafase-II con sus cinetocoros hermanos orientados anfitéticamente y enganchados a

haces de MTs provenientes de polos opuestos, no se detecta ninguna señal de RAD21 en los centrómeros (Fig. 11 M-P).

Es importante clarificar en este punto que el hecho de no encontrar marcaje de RAD21 en espermatoцитos en metafase-II no se debe a inaccesibilidad de los anticuerpos al centrómero en este estadio celular, ya que sí que hemos podido detectar otras proteínas pasajeras del dominio interno del centrómero como por ejemplo Aurora-B, u otras proteínas como SGOL2 y Topo II cuya localización e imágenes se muestran en apartados posteriores.



**Figura 10.** Triple inmunolocalización de RAD21 (verde), Tubulina (rojo) y los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatoцитos aplastados en diferentes etapas de la primera división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Prometafase-I. Los bivalentes se están anclando a MTs y sufriendo los movimientos de congregación. RAD21 marca los centrómeros con forma de "T" y el dominio intercromatídico a modo de débiles parches. (E-H) Metafase-I. Los bivalentes se encuentran alineados en la placa ecuatorial. Se aprecian las fibras cinetocóricas provenientes de polos opuestos ancladas a los cinetocoros homólogos, los cuales se orientan de manera sintética. Las cabezas de flecha blancas indican aglomerados citoplasmáticos de RAD21 que aparecen en prometafase-I (A, C) y metafase-I (E, G). (I-L). Anafase-I temprana. Los homólogos recombinados migran a polos opuestos. Se observan claramente haces de MTs cinetocóricos provenientes de ambos polos. La señales de RAD21 entre los brazos se han perdido y sólo persisten las señales centroméricas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 5  $\mu$ m.

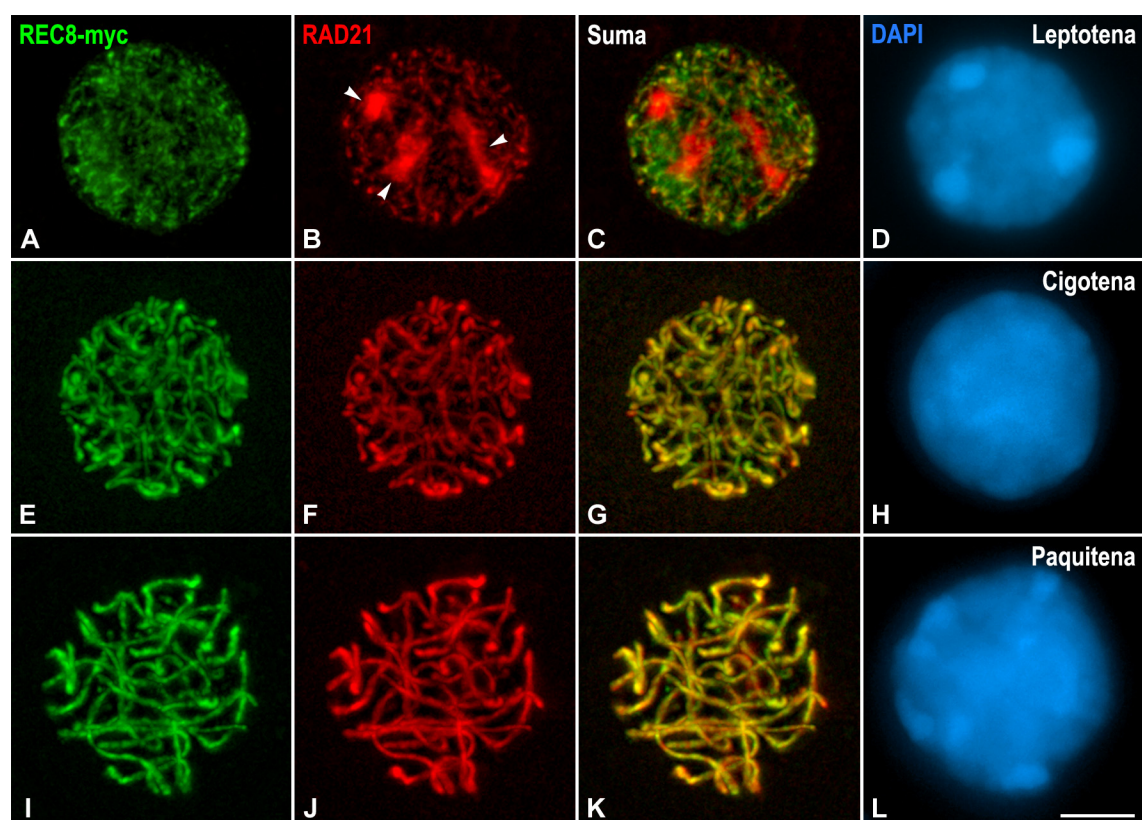


**Figura 11.** Triple inmunolocalización de RAD21 (verde), Tubulina (rojo) y los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas meióticas. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Anafase-I tardía. Los cromosomas homólogos ya han alcanzado los polos de forma que las fibras cinetocóricas dejan de observarse mientras que los MTs interzonales permanecen en la zona media del huso. Persisten las señales centroméricas de RAD21. Las cabezas de flecha rojas indican aglomerados citoplasmáticos de RAD21 (E-H) Telofase-I. Se diferencian claramente los microtúbulos interzonales agregados en el cuerpo medio. Las señales centroméricas de RAD21 han cambiado a forma de barra. Las cabezas de flecha rojas indican aglomerados citoplasmáticos de RAD21. Las cabezas de flecha blancas en E y G indican las señales de RAD21 en forma de barra que se localizan bien entre los cinetocoros hermanos individualizados o ligeramente separados de los mismos, y que se muestran a mayor aumento en los detalles en G. (I-L) Intercinesis. Las barras de RAD21 son aún visibles. (M-P). Metafase-II. Los cromosomas están alineados en la placa ecuatorial con sus cinetocoros hermanos orientados anfitéticamente y enganchados a haces de MTs provenientes de polos opuestos. No se detecta ninguna señal de RAD21 en los centrómeros. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu\text{m}$ .



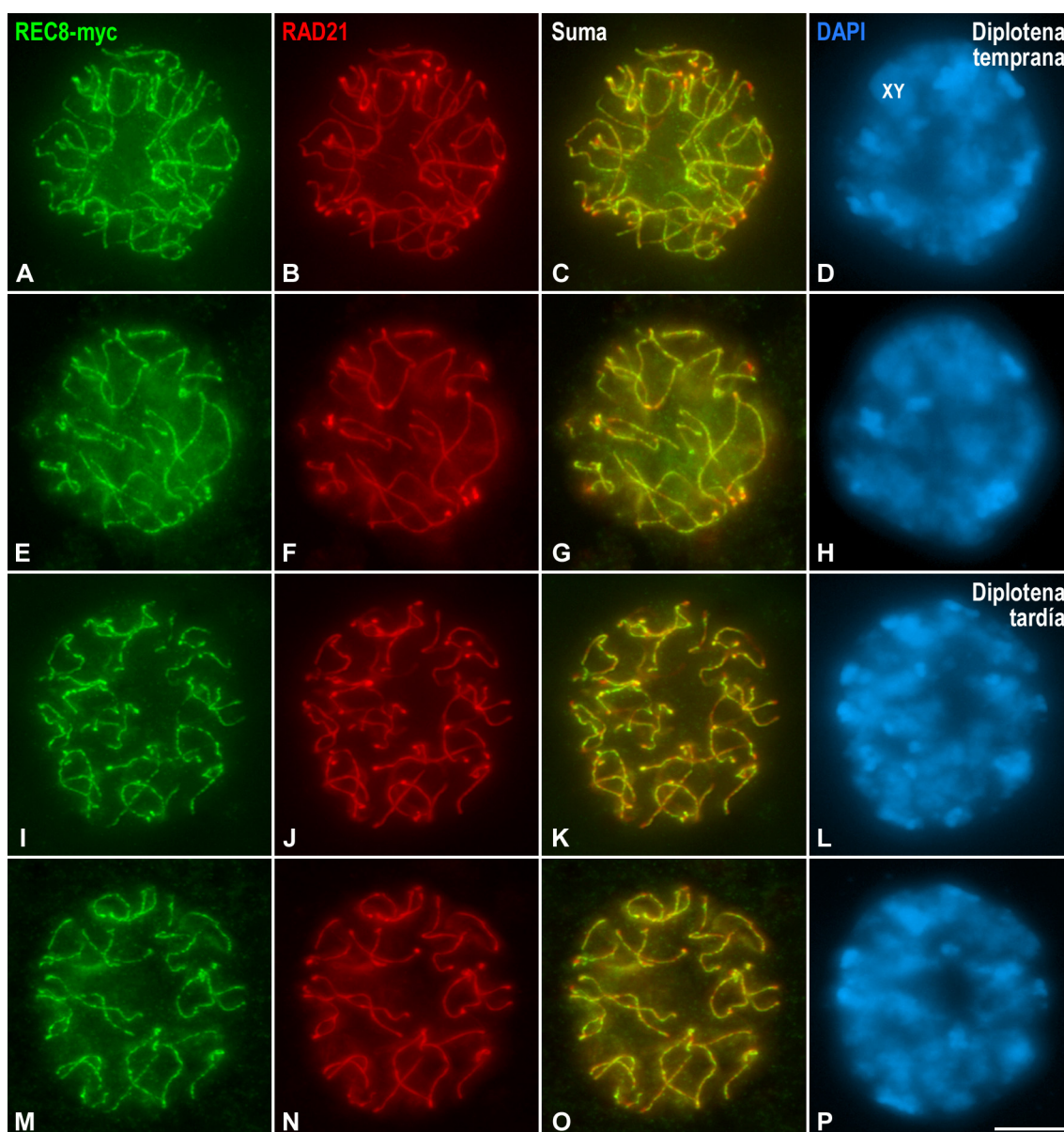
### 2.3. Distribución relativa de RAD21 y REC8

Para corroborar la coexistencia de REC8 y RAD21 en cromosomas meióticos hemos analizado su distribución relativa. Debido a que los anticuerpos anti-REC8 de los que disponemos no brindan una señal suficientemente intensa, decidimos realizar dobles inmunodetecciones de REC8 y RAD21 en los individuos REC8-*myc* de los que disponíamos, en los que podíamos observar la localización de REC8 utilizando anticuerpos secundarios anti-*myc* de forma más intensa y clara. Pudimos comprobar que las diferencias en distribución entre ambas proteínas comienzan ya a aparecer en leptotena, en la cual REC8 marca los EAs mientras que RAD21 también se localiza sobre ellos, además de en aglomerados que se corresponden con los nucleolos (Fig. 12 A-D) (Vídeo 8 en material suplementario). Es importante recordar que en las dobles inmunolocalizaciones en las que una proteína se marca en verde y otra en rojo, veremos color amarillo ahí donde ambas proteínas colocalicen. De este modo podemos ver que en cigotena ambas proteínas colocalizan totalmente en los EAs y ELs que han apareado (Fig. 12 E-H) (Vídeo 8 en material suplementario). En paquitena se produce una colocalización casi total en los ELs sinapsados, siendo la única diferencia entre los marcajes de RAD21 y REC8 que RAD21 marca las placas de asociación de los ELs a la EN y sin embargo REC8 no (Fig. 12 I-L y detalle en Fig. 15 A) (Vídeo 8 en material suplementario).



◀ **Figura 12.** Doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo) en espermatoцитos aplastados en diferentes etapas de la profase-I. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Leptotena. REC8 y RAD21 marcan los EAs. Las cabezas de flecha en B indican los acúmulos de RAD21 que se corresponden con las regiones nucleolares, las cuales no se marcan con REC8. (E-H) Cigotena. REC8 y RAD21 colocalizan totalmente en los EAs asinapsados y en los ELs sinapsados. (I-L) Paquitena. REC8 y RAD21 colocalizan totalmente marcando los ELs sinapsados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 5  $\mu$ m.

En diplotena, se observan las mismas diferencias en la distribución de REC8-*myc* y RAD21 que las que encontrábamos en paquitena (Fig. 13 y 15 B y C).



**Figura 13.** Doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo) en espermatoцитos aplastados en diplotena. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-P) REC8 y RAD21 colocalizan en los ELs sinapsados y desinapsados. Únicamente RAD21 marca engrosamientos en los extremos de los ELs. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.

En diacinesis temprana vuelven a apreciarse diferencias en la distribución de ambas proteínas ya que REC8 aparece en el dominio intercromatídico a modo de parches lineares, mientras que RAD21 se localiza entre las cromátidas alternando una señal tenue marcando los ELs desinapsados y otras señales en forma de engrosamientos a lo largo de los mismos (Fig. 14 A-D y cabezas de flecha en Fig. 15 D-F). Los engrosamientos de RAD21 aparecen al tiempo tanto en bivalentes autosómicos como en el bivalente sexual en ELs desinapsados y EAs asinapsados, respectivamente (Fig. 14 A-D y 15 D-F). Curiosamente, en espermatocitos en esta etapa hemos encontrado que REC8 marcaba asimismo los restos del nucleolo cuando realizamos inmunolocalizaciones en ratones normales con el anticuerpo anti-REC8 del Dr. Jibak Lee (ver Tabla 2 en Material y Métodos, imágenes no mostradas). En diacinesis tardía, los engrosamientos de RAD21 se hacen más evidentes, mientras que sigue sin detectarse sobre ellos marcaje de REC8 (Fig. 14 E-L y 15 F, G). Al final de esta etapa, los engrosamientos de RAD21 se separan de los ELs desinapsados para aparecer como aglomerados en el nucleoplasma (Fig. 15 G). De este modo comprobamos que el patrón de distribución de RAD21 durante la profase-I es semejante al que siguen las proteínas SYCP3 y SYCP2 del EL del CS descrito previamente (Parra y col., 2004), y que, por el contrario, REC8 sigue un patrón de marcaje exclusivo de EAs y ELs y en el dominio intercromatídico. Todas estas diferencias entre los marcajes de REC8 y RAD21 que hemos descrito en los bivalentes autosómicos durante las distintas etapas de la profase-I se aprecian también en el bivalente sexual (Fig. 16 A-D).

En prometafase-I, REC8 se localiza predominantemente en el dominio intercromatídico de todos los bivalentes, en cambio podemos apreciar claramente la señal de RAD21 en el dominio intercromatídico, en las regiones centroméricas a modo de estructuras redondeadas y en acúmulos o aglomerados en el citoplasma (Fig. 15 H, 16 E y 17). A medida que progresa la prometafase-I podemos ver que si bien las señales de REC8 y RAD21 no varían en el dominio intercromatídico, la señal de RAD21 en el centrómero adopta una conformación en forma de “T” o “Y” y las acumulaciones en el citoplasma son cada vez menos abundantes (Fig. 17 I-L). Es importante resaltar que las señales de REC8 y RAD21 colocalizan de manera prácticamente total en el dominio intercromatídico puesto que en las imágenes combinadas de ambas proteínas en las que una de ellas se ha marcado en rojo y otra en verde, observamos entre las cromátidas una señal parcheada prácticamente amarilla, si bien existen pequeñas zonas donde

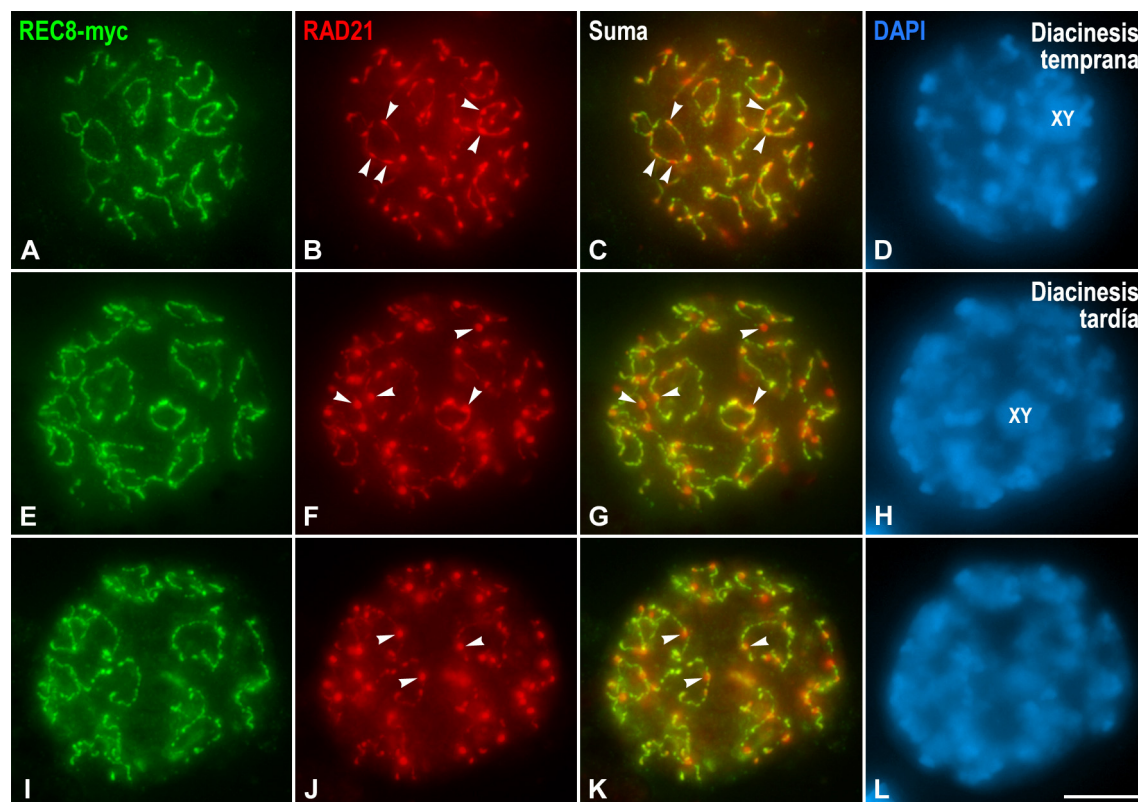
predomina más el verde o el rojo (Fig. 17 I-L). En metafase-I REC8 y RAD21 siguen teniendo distinta localización. De este modo, mientras que REC8 se encuentra mayoritariamente localizada en el dominio intercromatídico, y también en una subregión del dominio centromérico interno, RAD21 se localiza principalmente en el dominio centromérico interno y de forma menos intensa en el dominio intercromatídico (Fig. 18 A-D, A'-D'). Estos distintos marcajes se aprecian claramente a mayor aumento en los bivalentes autosómicos (Fig. 19 A) y en el sexual (Fig. 16 F y 19 B). Cuando encontramos univalentes sexuales en metafase-I también podemos detectar REC8 y RAD21 con la misma distribución que la encontrada en los bivalentes (Fig. 19 C, D). Es interesante mencionar que la señal intercromatídica de REC8 y RAD21 en los univalentes sexuales parece girar helicoidalmente (Fig. 19 C, D).

Tras la liberación de la cohesión braquial en anafase-I, REC8 persiste en una subregión del dominio interno del centrómero en forma de coma, mientras que RAD21 aparece en visiones laterales mostrando una forma de “T” en el dominio interno del centrómero (Fig. 18 D-G). Es importante destacar que REC8 y RAD21 sólo colocalizan en la región vertical de la forma de “T” marcada con RAD21 (detalles en Fig. 18 D-F). En una visión polar se observa que la señal de REC8 tiene forma de pequeño punto que justo se localiza entre los dos anillos unidos de RAD21 (detalles en Fig. 18 H-J). Estos resultados indican que aunque ambas proteínas permanecen en el dominio centromérico interno en anafase-I su distribución es distinta. Durante la telofase-I tardía las señales de REC8 en forma de coma que permanecían en el centrómero comienzan a difundir mientras que, como se ha comentado antes, RAD21 pasa a adquirir una conformación en forma de barras entre los cinetocoros hermanos individualizados, si bien todavía se observan algunos cromosomas con señales en forma de doble anillo (Fig. 18 H-K).

Durante la segunda división meiótica, en intercinesis sólo se puede apreciar RAD21 en forma de barras sobre los cromocentros y un leve marcaje difuso de REC8 (Fig. 18 L-O). Sin embargo, en metafase-II sólo encontramos señal de REC8 en forma de pequeños puntos entre los cinetocoros hermanos, no observándose ninguna señal de RAD21 (Fig. 18 P-S).

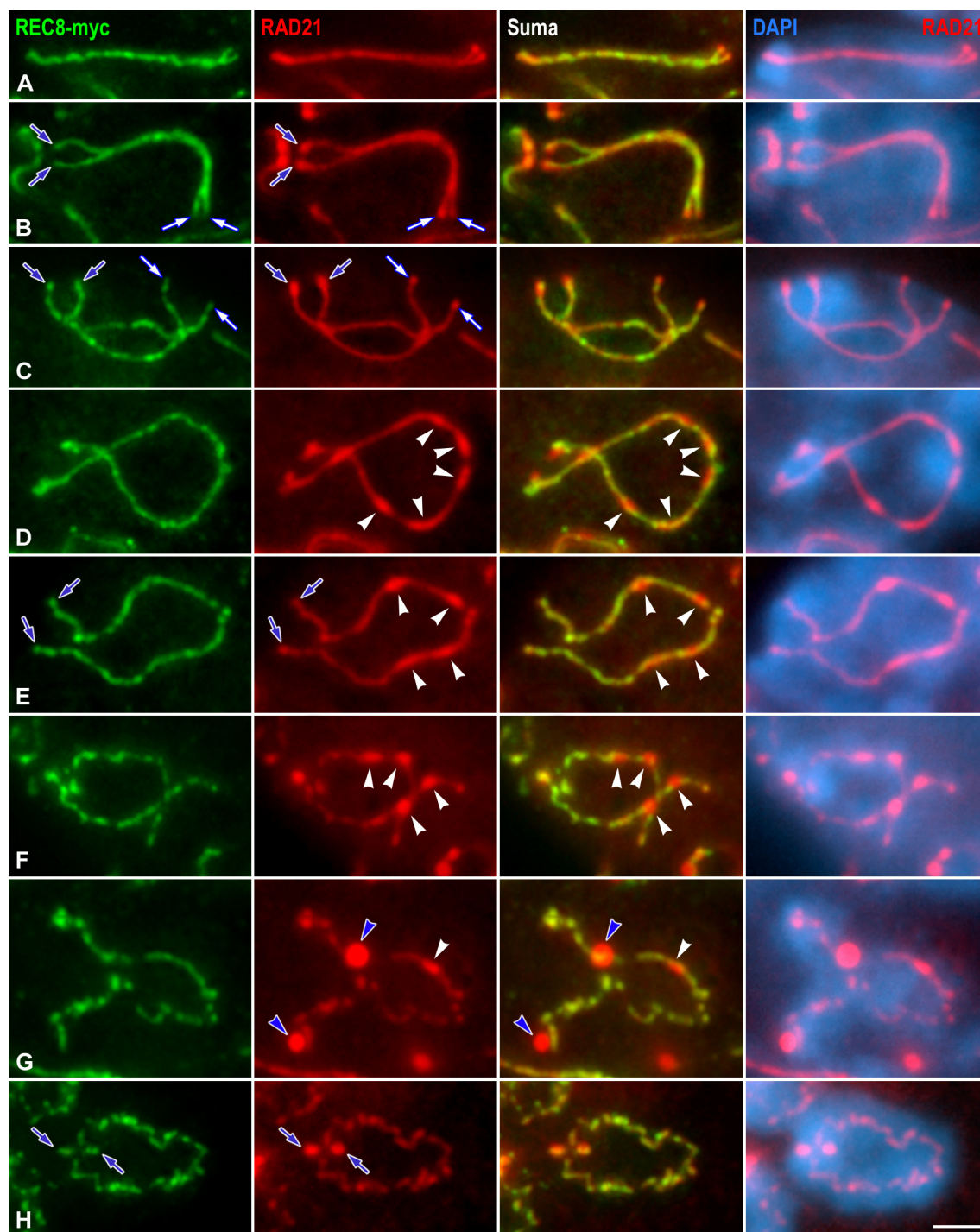
Todos estos resultados concuerdan con las localizaciones de REC8 y RAD21 que habíamos observado al realizar inmunodetecciones simples de cada una de ellas por separado.



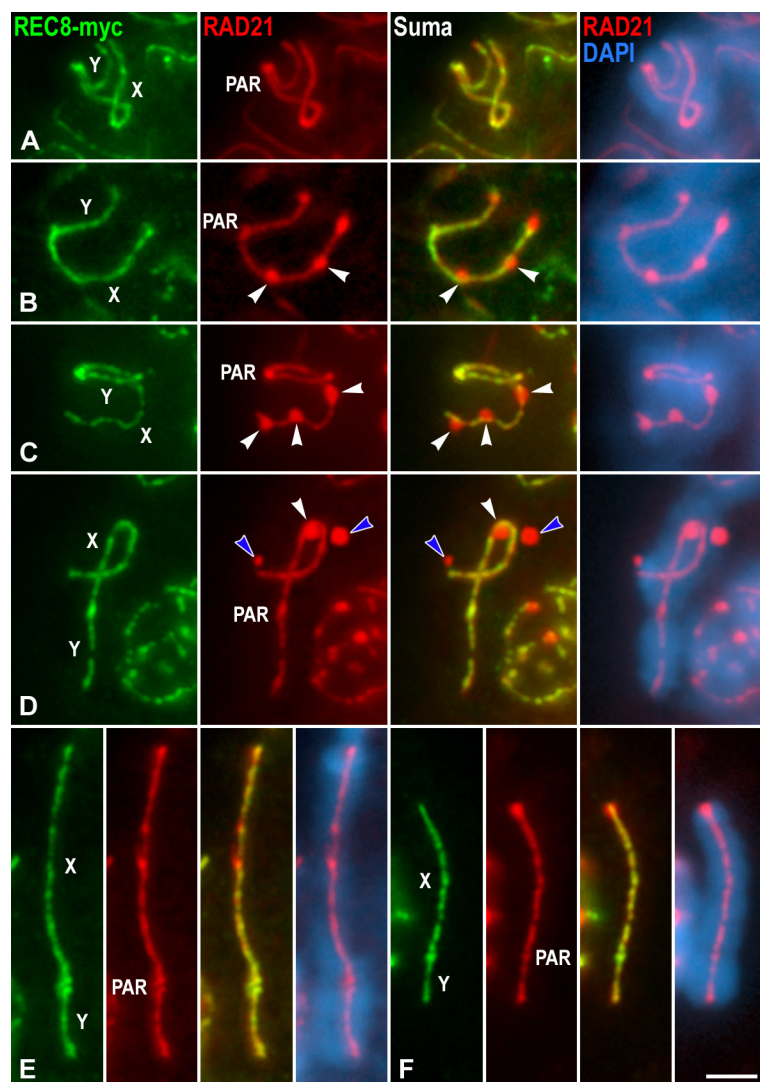


**Figura 14.** Doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo) en espermatocitos aplastados en diacinesis. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). REC8 marca los ELs desinapsados, mientras que RAD21 marca levemente los ELs con pequeños engrosamientos a lo largo de los mismos (cabezas de flecha blancas). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 5  $\mu$ m.



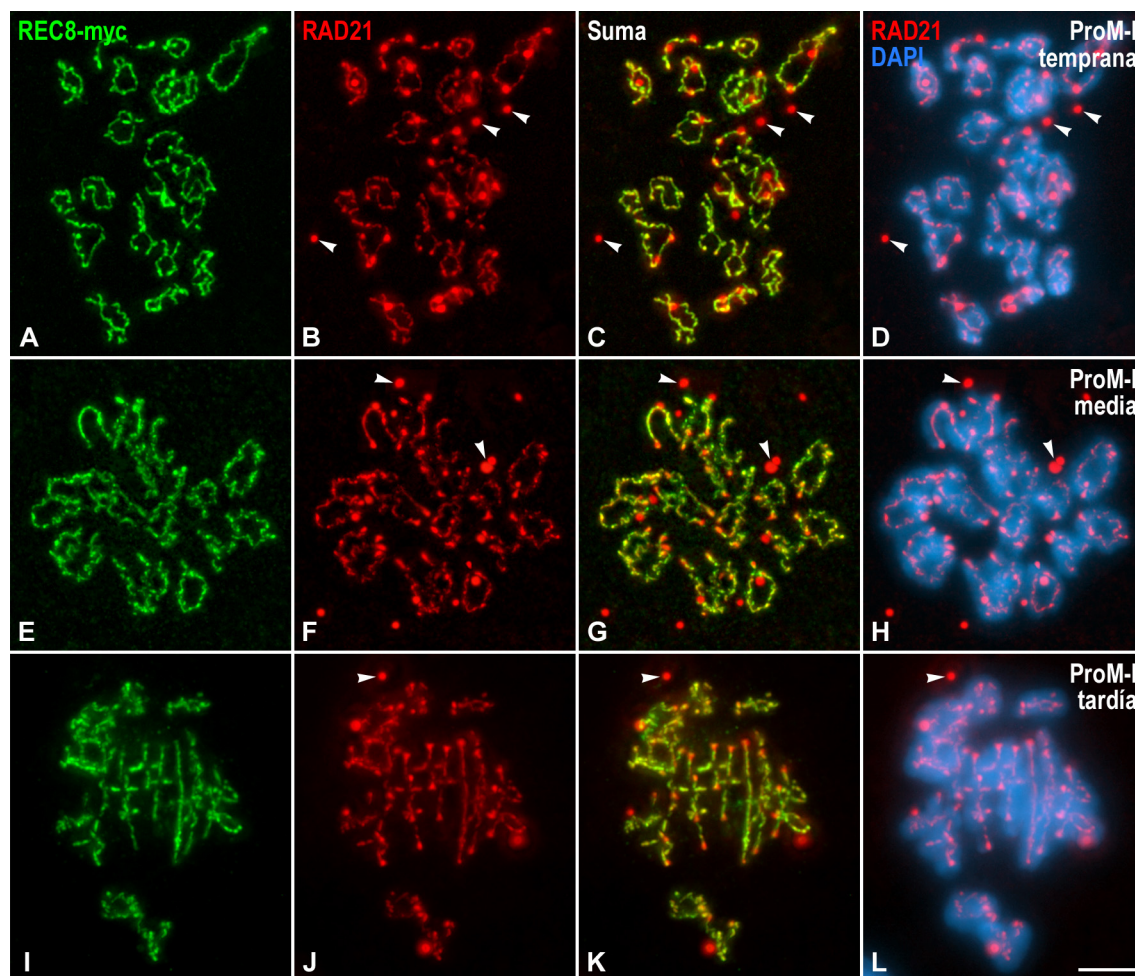


**Figura 15.** Detalles de la doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo) en bivalentes autosómicos seleccionados durante la profase-I. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A) Paquitena. REC8 y RAD21 colocalizan en los ELs sinapsados, pero únicamente RAD21 marca engrosamientos en los extremos proximales y distales. (B, C) Diplotena. Las flechas azules indican los extremos centroméricos proximales de los ELs en los que sólo se aprecian engrosamientos de RAD21. Las flechas blancas indican los extremos teloméricos distales de los ELs en los que sólo se aprecian engrosamientos de RAD21. (D, E) Diacinesis temprana. Las flechas azules en E indican los extremos centroméricos de los ELs. Las cabezas de flecha blancas indican los engrosamientos sobre los ELs desinapsados que se observan con RAD21. (F-H) Diacinesis tardía. Las cabezas de flecha azules en G indican los aglomerados de RAD21 que se han desprendido de los ELs desinapsados. Las flechas azules en H indican los extremos centroméricos de los ELs desinapsados en los que se observa una intensa señal engrosada únicamente de RAD21. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en H representa 2  $\mu\text{m}$ .

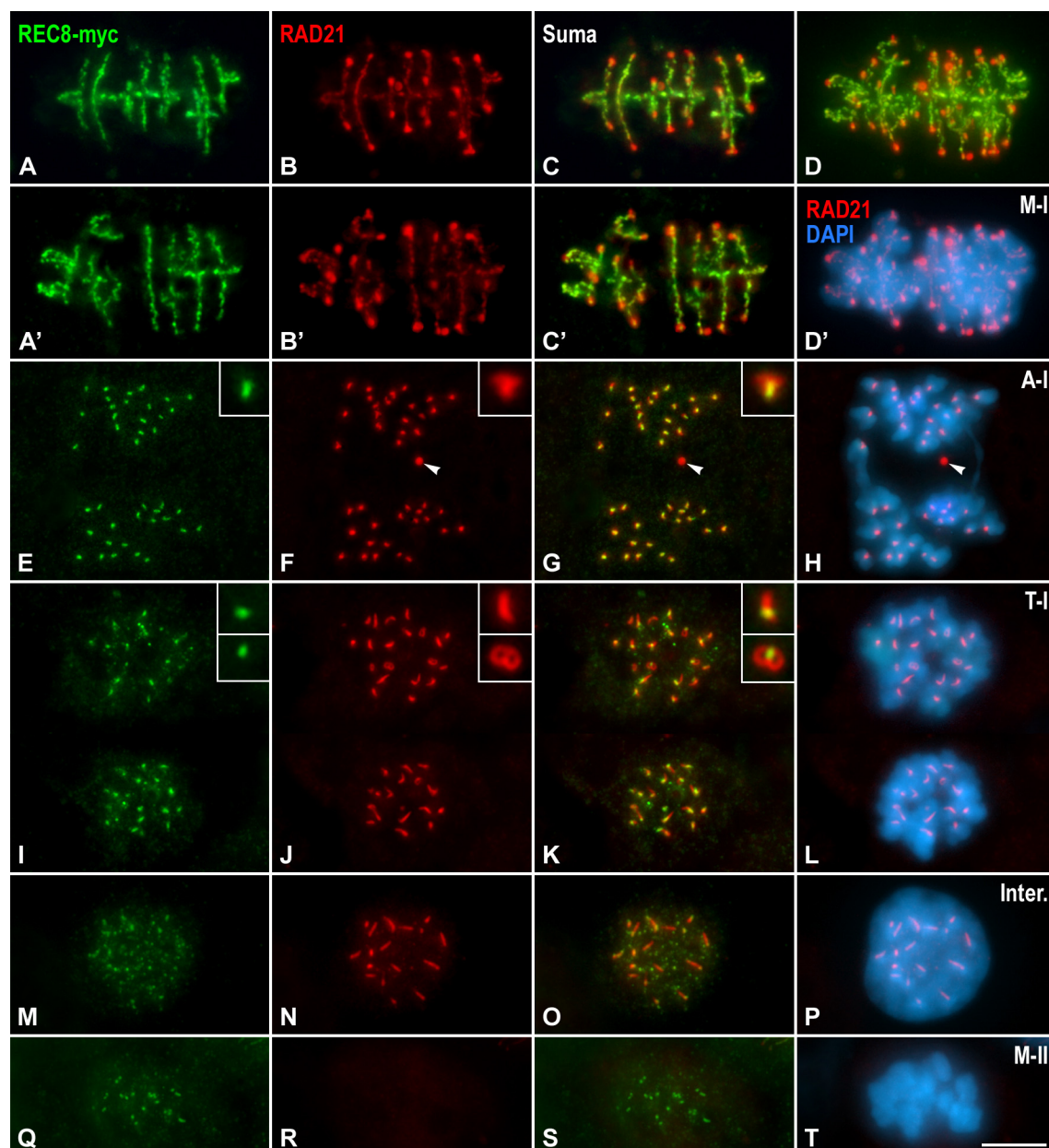


**Figura 16.** Detalles de la doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo) en bivalentes sexuales seleccionados durante la profase-I. (A-D), en prometafase-I (E) y en metafase-I (F). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A) Paquitena. REC8 y RAD21 marcan los EAs asinapsados. (B-D) Diplotena y diacinesis. Las cabezas de flecha blancas indican los engrosamientos de RAD21 sobre el EAs del cromosoma X en diplotena tardía (B, C) y en diacinesis (D). Las cabezas de flecha azules en D indican los aglomerados de RAD21 que se han desprendido del EA del cromosoma X. (E) Prometafase-I. REC8 y RAD21 colocalizan en el dominio intercromatídico del bivalente XY. (F) Metafase-I. REC8 y RAD21 colocalizan en el dominio intercromatídico del bivalente XY. La señal centromérica de RAD21 en el cromosoma X aparece con una clara forma de “T”. La región pseudoautosómica de los cromosomas X e Y está indicada (PAR). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en F representa 2  $\mu$ m.

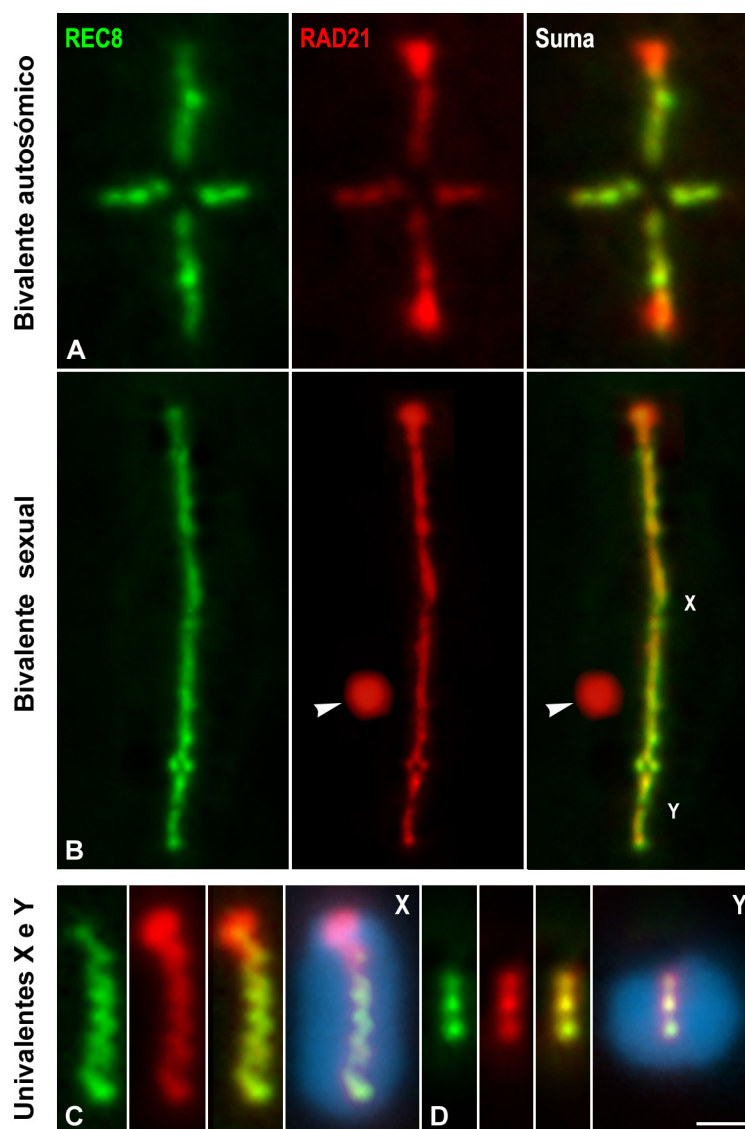




**Figura 17.** Doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo) en espermatocitos aplastados en prometafase-I. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-L) Prometafase-I temprana, media y tardía. REC8 marca el dominio intercromatídico con una señal parcheada. RAD21 marca levemente el dominio intercromatídico con una señal parcheada y los centrómeros con una intensa señal en forma de "T". Las cabezas de flecha blancas indican aglomerados citoplasmáticos de RAD21. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 5  $\mu$ m.



**Figura 18.** Doble inmunolocalización de REC8-myc (verde) y RAD21 (rojo) en espermatocitos aplastados durante diferentes etapas meióticas. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Metafase-I. REC8 se localiza en el dominio intercromatídico con una señal parcheada. RAD21 colocaliza con REC8 en el dominio intercromatídico y además se detecta en los centrómeros con una intensa señal en forma de "T". (E-H) Anafase-I. REC8 se detecta como pequeñas comas en las regiones centroméricas, mientras que RAD21 persiste con forma de "T". No se detecta ninguna señal ni de REC8 ni de RAD21 en el dominio intercromatídico. Las cabezas de flecha blancas indican aglomerados citoplasmáticos de RAD21. Los detalles muestran a gran aumento un centrómero en el que se aprecia la colocalización parcial de REC8 y RAD21. (I-L) Telofase-I. Las señales con forma de coma de REC8 se hacen más difusas mientras que RAD21 cambia su conformación a forma de barras. Los detalles muestran a gran aumento las visiones laterales y frontales de la colocalización parcial de REC8 y RAD21 en un centrómero seleccionado. (M-P) Intercinesis. La señal de REC8 se aprecia como un leve punteado mientras que persisten las barras de RAD21. (Q-T) Metafase-II. REC8 se detecta como pequeños puntos mientras que no se observa ninguna señal de RAD21. (A-C y A'-C') Estas imágenes corresponden a diferentes planos focales de una misma metafase-I. (D y D') Proyección en el eje z de todos los planos de la metafase-I. (E-T) El resto de las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). La barra de medida en S representa 5  $\mu$ m.



**Figura 19.** Detalles de la doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en un bivalente autosómico seleccionado en metafase-I (A) así como en un bivalente sexual. (B) y en univalentes X (C) e Y (D). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). REC8 se localiza en el dominio intercromatídico de los bivalentes autosómicos, del bivalente sexual y de los univalentes X e Y. RAD21 se localiza levemente en el dominio intercromatídico e intensamente en los centrómeros de los bivalentes autosómicos y del univalente X con una señal en forma de “T”. La señal intercromatídica de REC8 y de RAD21 es más intensa en el bivalente sexual que en los bivalentes autosómicos. Las cabezas de flecha blancas en B indican un aglomerado citoplasmático de RAD21. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 2  $\mu$ m.

## 2.4. Distribución de SMC3

Se ha propuesto que SMC3 aparece en los EAs en cigotena (Eijpe y col., 2000) y que colocaliza con las proteínas SYCP2 (Offenberg y col., 1998) y SYCP3 (Lammers y col., 1994) de los ELs del CS en rata. También se ha descrito en esparcidos de rata que SMC3 desaparece de la región intercromatídica en metafase-I (Revenkova y col., 2001). Para corroborar estos datos en la meiosis de ratón, se inmunolocalizó SMC3 en aplastados de túbulos seminíferos probando siete anticuerpos diferentes, de los cuales únicamente dos rindieron resultados positivos e idénticos (ver Tabla 2 de Material y Métodos). Las imágenes mostradas corresponden al anticuerpo anti-SMC3 de la casa comercial Chemicon.

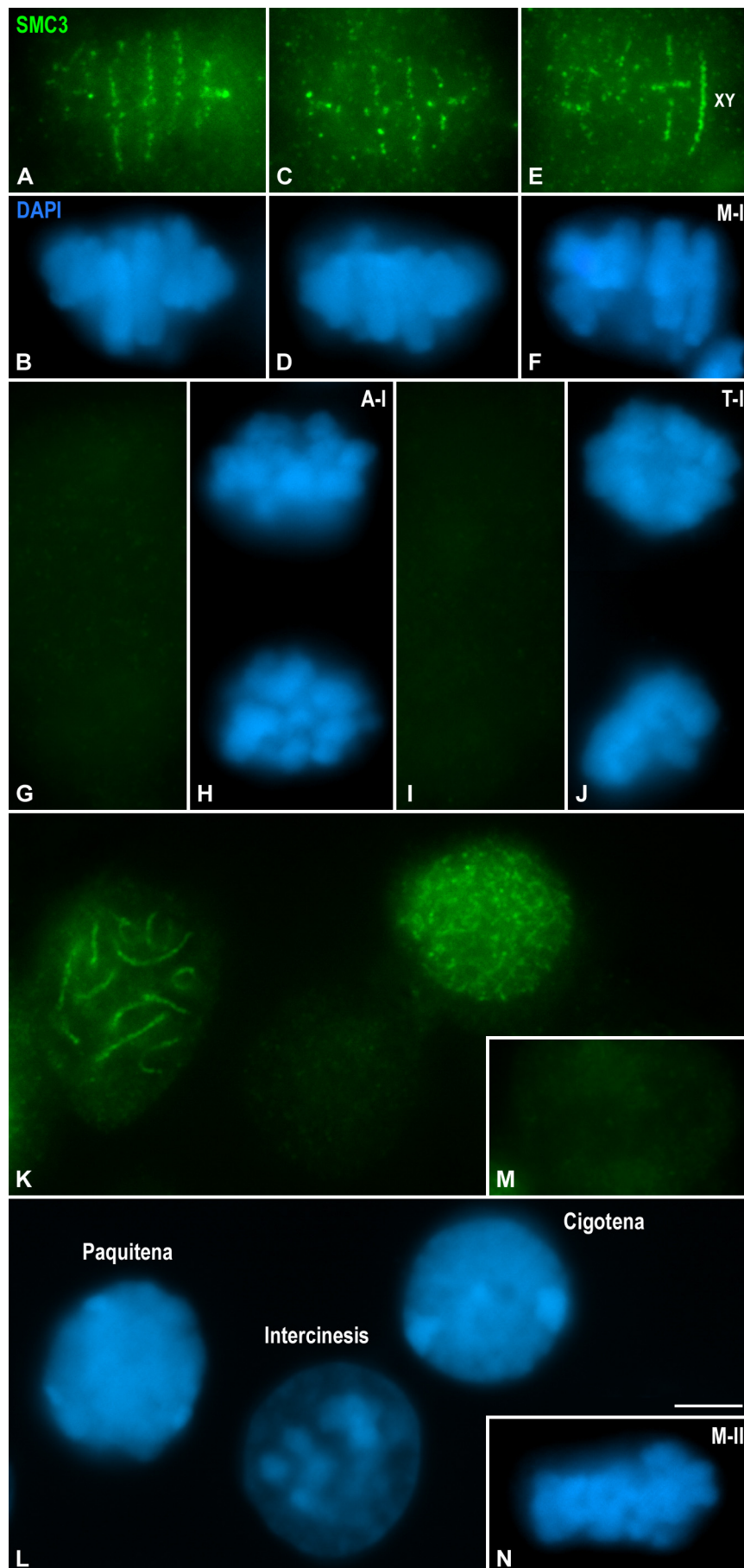
Nuestras observaciones demuestran que en ratón, al igual que ocurre en rata, SMC3 se localiza en los EAs en leptotena-cigotena y por lo tanto en los ELs en paquitena (Fig. 20 K, L). En metafase-I, SMC3 se localiza a modo de parches en el dominio intercromatídico tanto en los bivalentes autosómicos como en el sexual, y tal y como ocurría para REC8 y RAD21, el marcaje es más brillante en este último (Fig. 20 A-F). Al analizar las imágenes a mayor aumento, vemos que el marcaje intercromatídico de SMC3 invade el dominio centromérico interno pero no colocaliza con las señales cinetocóricas ni en los bivalentes autosómicos ni en el sexual (Fig. 21 A, B).

Con los anticuerpos de los que disponemos hemos observado que el marcaje de SMC3 del dominio intercromatídico y del centrómero se pierden en la transición metafase-I/anafase-I y por tanto no se observa tampoco en telofase-I (Fig. 20 G-J). En intercinesis tampoco se detecta SMC3 (Fig. 20 K, L), y al igual que ocurre con RAD21, no se detecta ningún tipo de señal en los centrómeros en metafase-II (Fig. 20 M, N).

---

► **Figura 20.** Inmunolocalización de SMC3 (verde) en diferentes etapas de la meiosis. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-F) Metafase-I. SMC3 marca el dominio intercromatídico con una señal a modo de parches. (G-J) Anafase-I y telofase-I. No se observa ningún marcaje de SMC3. (K) SMC3 marca los EAs y ELs del CS durante la profase-I. No se observa ningún marcaje de SMC3 en intercinesis. (M, N) Metafase-II. No se observa ningún marcaje de SMC3. Las imágenes A a F son diferentes planos focales de una misma metafase-I. Las imágenes K a L muestran un único plano focal. La barra de medida en L representa 5 µm.



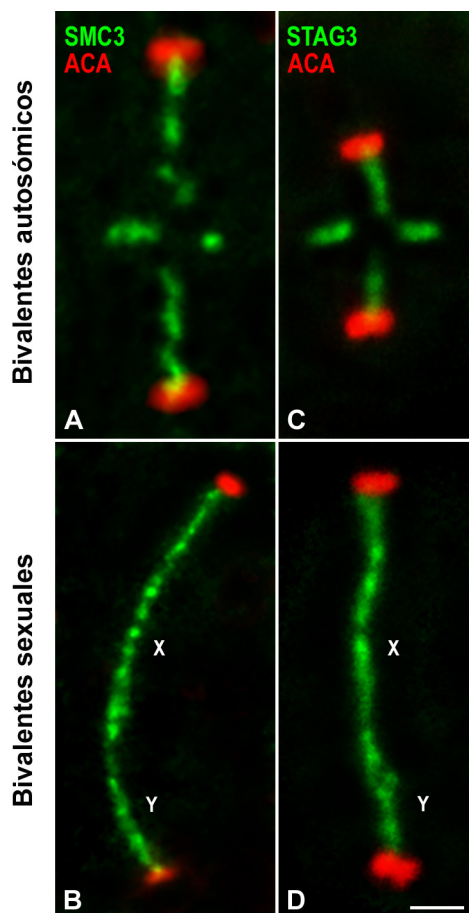


### **2.5. Distribución de STAG3**

Para estudiar la distribución de la cohesina STAG3 se han probado tres anticuerpos diferentes, de los cuales únicamente uno rindió resultados positivos (ver Tabla 2 de Material y Métodos). Las imágenes mostradas corresponden por tanto al suero K403 amablemente cedido por el Dr. José Luis Barbero (Prieto y col., 2001).

Al igual que las otras cohesinas, STAG3 se localiza en lo EAs/ELs del CS durante la profase-I. De este modo, en leptotena y cigotena se localiza en los EAs y en paquitena en los ELs ya sinapsados del CS. Desde diplotena tardía hasta prometáfase-I, STAG3 se va eliminando parcialmente de los ELs desinapsados (Prieto y col., 2001), al igual que ocurre con la cohesina RAD21 y también SYCP3 (Parra y col., 2004) (imágenes no mostradas). En metafase-I STAG3 se localiza, al igual que REC8 y SMC3, a lo largo del dominio intercromatídico interrumpiéndose únicamente en los puntos de quiasma (Fig. 21 C, D). Así mismo, al igual que ocurre con REC8, nuestros resultados demuestran que STAG3 aparece por debajo de las señales de los cinetocoros hermanos que están íntimamente asociados, por lo que sí se encuentra en el dominio centromérico interno, pero nunca colocaliza con ellos (Fig. 21 C, D). Como ya hemos comentado para REC8, RAD21 y SMC3, el marcaje de STAG3 en el dominio intercromatídico es más intenso en el bivalente sexual que en los bivalentes autosómicos (comparar Fig. 21 C y D). STAG3 se libera de los brazos entre metafase-I y anafase-I, al igual que RAD21 y SMC3, y nunca la hemos encontrado en los centrómeros de los cromosomas en metafase-II (imágenes no mostradas).





**Figura 21.** Detalles de la doble inmunolocalización de SMC3 y STAG3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en dos bivalentes autosómicos seleccionados (A, C) y en dos bivalentes sexuales (XY) en metafase-I (B, D). (A-D) Tanto en los bivalentes autosómicos como en el sexual SMC3 y STAG3 marcan el dominio intercromatídico con una señal parcheada que llega hasta justo debajo de los cinetocoros hermanos, y que únicamente se ve interrumpida en la región del quiasma. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 1  $\mu$ m.

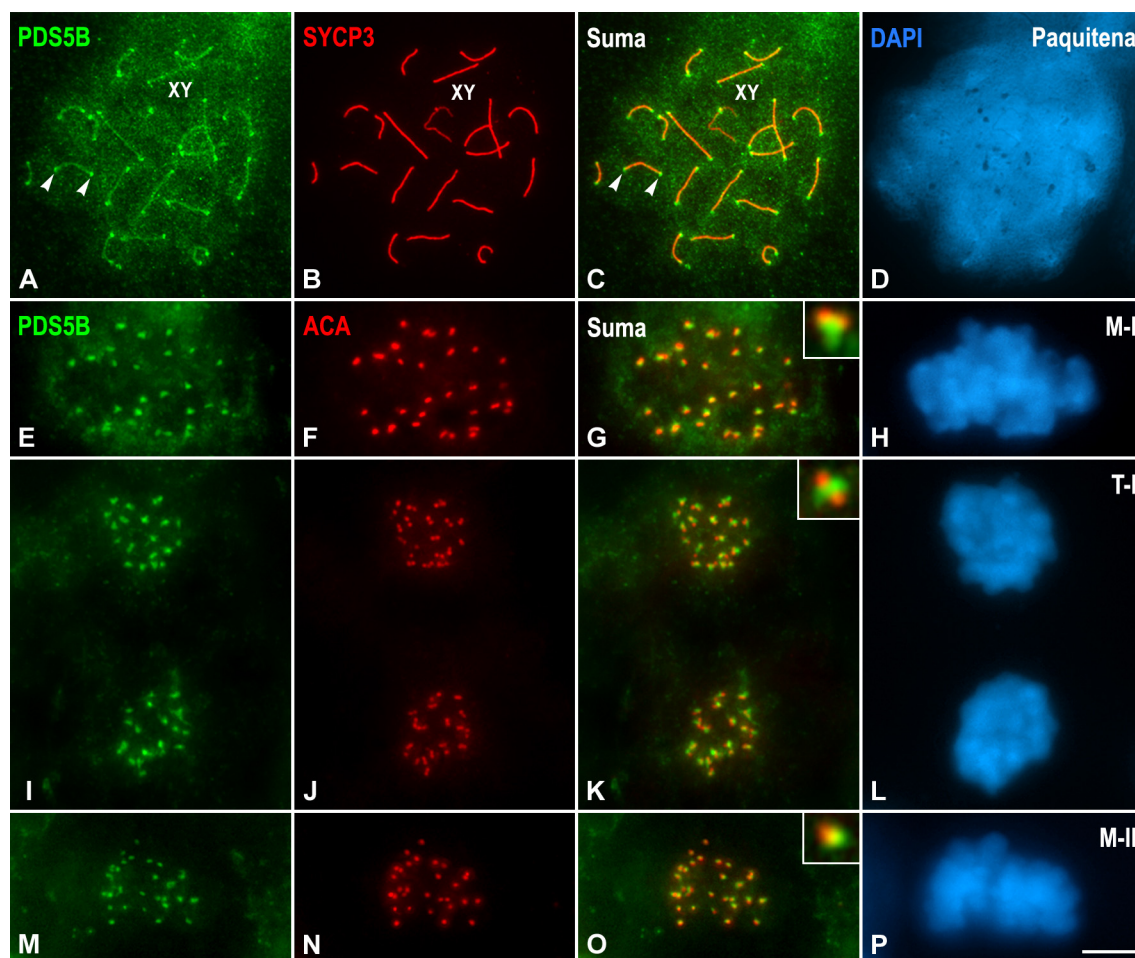
### 3. Localización de los cofactores del complejo de cohesina

Dada la importancia que en los últimos años se está dando a los llamados cofactores del complejo de cohesina, uno de nuestros objetivos fue analizar la distribución de Sororina, PDS5B y WAPL.

En primer lugar tenemos que comentar que hemos intentado estudiar la distribución de Sororina mediante un anticuerpo contra dicho cofactor cedido por la Dra. Susan Rankin (Rankin, 2005) (Tabla 2 en Material y Métodos) Desafortunadamente, no hemos podido obtener ninguna reacción positiva con este anticuerpo, incluso probando con diferentes tipos de fijaciones.

### **3.1. Distribución de PDS5B**

Debido a que PDS5B es uno de los cofactores del complejo de cohesina que desempeña un importante papel regulador de la cohesión decidimos intentar analizar su distribución. Se utilizaron múltiples anticuerpos (ver Tabla 2 en Material y Métodos, Losada y col., 2005). El único anticuerpo que rindió una reacción positiva en aplastado fue el cedido por la Dra. Ana Losada del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) y en esparcido el anticuerpo PDS5B C101 purificado cedido por el Dr. José Luis Barbero del CIB (Centro de Investigaciones Biológicas). Desafortunadamente, ninguno de los dos anticuerpos tiene una alta reactividad, por lo que la señal que se obtiene es muy leve. Por este motivo, no hemos podido mostrar las imágenes de la localización de PDS5B en todas y cada una de las etapas meióticas. Sin embargo, dada la gran importancia que se está dando últimamente a esta proteína en diversos aspectos del fenómeno de la cohesión, mostraremos las imágenes más significativas de su localización. En esparcidos de espermatoцитos de ratón, PDS5B aparece en los EAs/ELs del CS durante toda la profase-I con la misma localización que SYCP3 (Fig. 22 A-D). Curiosamente, en paquitena, PDS5B marca también unos engrosamientos tanto en el extremo centromérico como en el telomérico distal de todos los CSs autosómicos, y únicamente en el extremo PAR del bivalente XY que corresponde con los extremos teloméricos distales (Fig. 22 A-D). Además, únicamente en aplastado se marca el cuerpo sexual durante la profase-I (imágenes no mostradas). En metafase-I PDS5B aparece en los centrómeros bajo los cinetocoros hermanos asociados en una estructura en forma de “T” (Fig. 22 E-H) y en algunas ocasiones también marca el dominio intercromatídico del bivalente sexual. Este marcaje centromérico de PDS5B es muy similar al de SYCP3. La señal centromérica de PDS5B persiste hasta la telofase-I adquiriendo forma de pequeñas barras cercanas a los cinetocoros (Fig. 22 I-L). Además, PDS5B aparece también como una pequeña señal cercana a los cinetocoros en metafase-II (Fig. 22 M-P) que recuerda a la señal que hemos observado para SGOL2 y que se describirá más adelante (Fig. 27 M, P), pues parecen pequeños puntos o parejas de puntos bajo los cinetocoros hermanos, y que incluso en alguna ocasión recuerdan a anillos en vista polar. Sin embargo, no hemos detectado bandas de PDS5B entre los cinetocoros hermanos. En telofase-II persiste una leve señal de PDS5B en forma de pequeño punto que colocaliza parcialmente con las señales cinetocóricas (imágenes no mostradas).



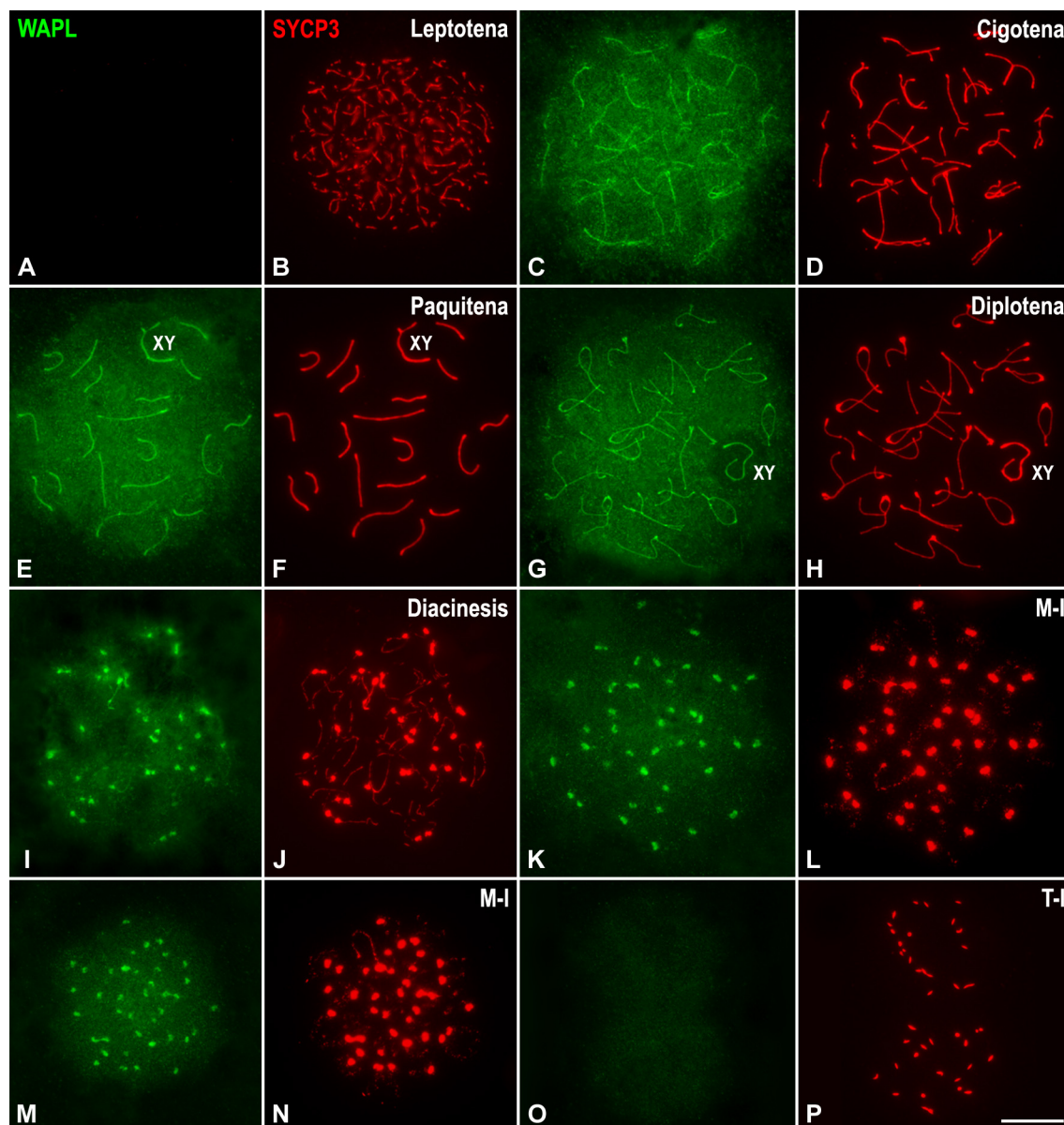
**Figura 22.** Doble inmunolocalización de PDS5B (verde) y SYCP3 (rojo) en un espermatocito esparcido en paquitena (A-D). Doble inmunolocalización de PDS5B (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas meióticas. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Paquitena. PDS5B marca los ELs de los bivalentes autosómicos, así como unos engrosamientos en los extremos de los ELs de todos los bivalentes (cabezas de flecha). (E-H) Metafase-I. PDS5B marca unas intensas señales en forma de “T” en los centrómeros. El detalle en G muestra a mayor aumento un centrómero en el que se aprecia la colocalización parcial de PDS5B y los cinetocoros. (I-L) Telofase-I. PDS5B marca unas señales en forma de barra que se encuentran entre los cinetocoros hermanos o ligeramente separadas de los mismos. El detalle en K muestra a mayor aumento la señal centromérica de PDS5B con forma de barra entre los cinetocoros hermanos. (M-P) Metafase-II. PDS5B marca señales redondeadas justo debajo de los cinetocoros. El detalle en O muestra a mayor aumento un centrómero en el que se aprecia una pequeña señal de PDS5B que colocaliza parcialmente con la señal cinetocórica. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.

### 3.2. Distribución de WAPL

WAPL es otro de los cofactores del complejo de cohesina que en los últimos años está tomando más importancia con respecto a su papel regulador del complejo de cohesina.

Tras realizar la doble inmunodetección de WAPL junto con la proteína SYCP3, y utilizando el anticuerpos cedido por el Dr. Kuroda (ver Tabla 2 en Material y Métodos) sobre esparcidos de ratón, observamos que WAPL colocaliza con SYCP3 marcando los EAs/ELs de CS desde cigotena (Fig. 23 C, D), puesto que no se detecta en leptotena (Fig. 23 A, B). La señal de WAPL también colocaliza con SYCP3 marcando los ELs del CS en paquitena (Fig. 23 E, F) y diplotena (Fig. 23 G, H). En diacinesis y metafase-I ambas proteínas marcan las regiones centroméricas, pero únicamente SYCP3 marca el dominio intercromatídico (Fig. 23 I-N). Por último, WAPL ya no se detecta en telofase-I, etapa en la cual vemos SYCP3 como barritas entre los cinetocoros hermanos (Fig. 23 O, P). Más allá de telofase-I ya no detectamos ninguna señal de WAPL. Es interesante resaltar en este punto que localizando WAPL también sobre espermatocitos esparcidos pero usando el anticuerpo decido por el Dr. Hirano (ver Tabla 2 en Material y Métodos) sólo pudimos detectar la proteína en CS hasta paquitena, pues a partir de diplotena ya no aparece ningún marcaje (imágenes no mostradas).

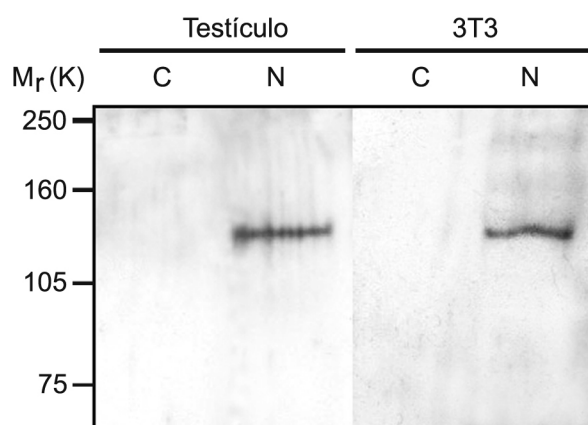
También hemos realizado pruebas de inmunodetección de WAPL en túbulos seminíferos aplastados, no obstante con ésta técnica sólo hemos podido apreciar las señales centroméricas de WAPL a partir de diacinesis, pero no hemos podido detectar señal en CS (imágenes no mostradas).



**Figura 23.** Doble inmunolocalización de WAPL (verde) y SYCP3 (rojo) en espermatocitos esparcidos en diferentes etapas de la primera división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) Leptotena. No se aprecia ningún marcaje de WAPL mientras que SYCP3 marca los EAs. (C, D) Cigotena. WAPL y SYCP3 colocalizan marcando los EAs asinapsados y los ELs sinapsados del CS. (E-H) Paquitena y diplotena. WAPL y SYCP3 colocalizan marcando los ELs sinapsados de todos los bivalentes y los EAs del bivalente sexual (XY). (I-N) Diacinesis y metafase-I. WAPL y SYCP3 colocalizan únicamente en los centrómeros. (O, P) Telofase-I. No aparece ningún marcaje de WAPL mientras que SYCP3 aparece con forma de pequeñas barras localizadas en las regiones centroméricas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.

#### **4. Localización de SGOL2**

Para estudiar la distribución de SGOL2, el equipo del Dr. José Luis Barbero con quien colaboramos en este estudio, generó y caracterizó dos anticuerpos policlonales de conejo anti-mSGOL2 (K1058 y K1059) (ver Tabla 2 en Material y Métodos, Gómez et al., 2007). Estos anticuerpos se generaron contra un péptido del dominio C-terminal. Se verificó la afinidad de dichos anticuerpos por la técnica de *Western Blot* sobre extractos nucleares de testículo de ratón y sobre células somáticas 3T3. Este procedimiento detectó una banda de alrededor de 130 kDa para ambos anticuerpos (Fig. 24) pudiendo observar que la movilidad de la banda concuerda con el peso molecular esperado de 128 kDa. Aunque ambos anticuerpos dieron iguales resultados, las imágenes mostradas corresponden al suero K1059.



**Figura 24.** *Western Blot* de SGOL2 en extracto de testículo de ratón y en extracto de células 3T3. La posición de los indicadores de peso molecular está indicada a la izquierda de la imagen. El carril C corresponde a la fracción citoplasmática y el carril N corresponde a la fracción nuclear.

##### **4.1. Primera división meiótica**

Para analizar la correcta distribución de SGOL2 durante la meiosis de ratón, realizamos dobles inmunodetecciones de SGOL2, de los cinetocoros, y de las cohesinas RAD21 y REC8. Nuestros resultados demuestran que SGOL2 es detectada por primera vez en diplotena tardía por debajo de los cinetocoros (Fig. 25 A-C). Cuando realizamos la doble inmunodetección junto con RAD21, pudimos ver como ésta marca los ELs desinapsados (Fig. 25 D) y justo en sus extremos proximales encontramos a SGOL2 (detalle en Fig. 25 D). Ya que en ratón, todos los cromosomas son telocéntricos, comprobamos que estos extremos corresponden a las regiones centroméricas. En diacinesis aparecen los engrosamientos de RAD21 a lo largo de los ELs desinapsados y acumulaciones en el nucleoplasma (Fig. 25 H) mientras que persiste la misma señal

centromérica de SGOL2 (Fig. 25 E-G). En los centrómeros SGOL2 colocaliza parcialmente con las señales cinetocóricas (detalle en Fig. 25 F).

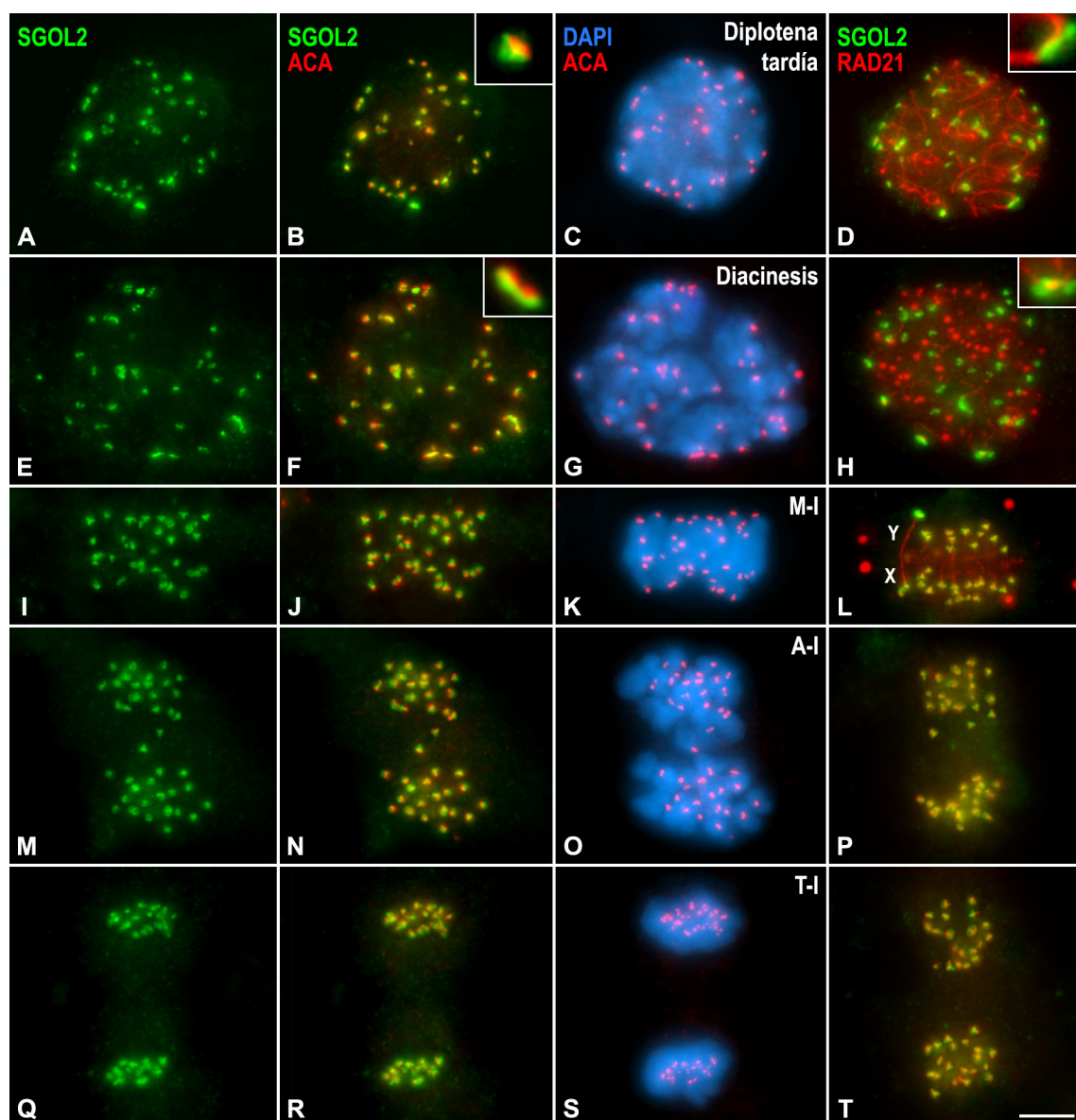
En metafase-I, momento en que los bivalentes están biorientados en la placa ecuatorial, observamos como SGOL2 aparece en los centrómeros colocalizando parcialmente con los cinetocoros (Fig. 25 I-K) y con la señal centromérica de RAD21 (Fig. 25 L). Realizando un estudio detallado a mayor aumento vemos que SGOL2 aparece en el dominio centromérico interno con una estructura en forma de “T” en visiones laterales y con forma de “doble anillo” en visiones polares (Fig. 26). Las señales en forma de “T” colocalizan parcialmente con las señales de los cinetocoros hermanos asociados (Fig. 26 A, B). Cuando la visión es polar, vemos que el doble anillo de SGOL2 abraza las señales cinetocóricas de igual modo que el “doble cornete” que explicamos para SYCP3 y RAD21 (Fig. 26 C). Al realizar la doble inmunolocalización de SGOL2 junto a RAD21 y estudiar los cromosomas a gran aumento vemos que ambas proteínas colocalizan en forma de “T” en el centrómero en visiones laterales (Fig. 26 F, G) y como dobles anillos en las visiones polares (Fig. 26 H). Sin embargo, la mayor diferencia entre ambas proteínas está en el dominio intercromatídico, ya que únicamente es marcado por RAD21 (Fig. 25 L y 26 F). Es interesante destacar también el marcaje que ambas proteínas tienen en el bivalente XY. Mientras que la señal centromérica de SGOL2 en el cromosoma X es normal, la señal en el centrómero del Y es mucho más grande y brillante en comparación con el resto de autosomas. Por el contrario, la señal de RAD21 en el XY es opuesta, ya que la señal centromérica del cromosoma X es mayor que la del cromosoma Y (Fig. 25 L).

También realizamos la doble localización de SGOL2 junto a REC8. En imágenes a gran aumento en bivalentes autosómicos en metafase-I vemos como la señal intercromatídica de REC8 invade también el dominio centromérico interno colocalizando parcialmente con la parte vertical de la señal en forma de “T” de SGOL2 (Fig. 26 K, L). Pudimos comprobar en las visiones polares que esta señal de REC8 estaba justo en el centro del doble anillo de SGOL2 (Fig. 26 M).

En anafase-I y telofase-I, una vez que los homólogos han segregado a polos opuestos, vemos que persiste la señal de SGOL2 en el centrómero (Fig. 25 M-O y Q-S). En visiones laterales de los centrómeros en telofase-I observamos que la señal de SGOL2 se ha ensanchado ligeramente y que los cinetocoros hermanos aparecen individualizados (Fig. 26 D). En visiones frontales observamos que los cinetocoros



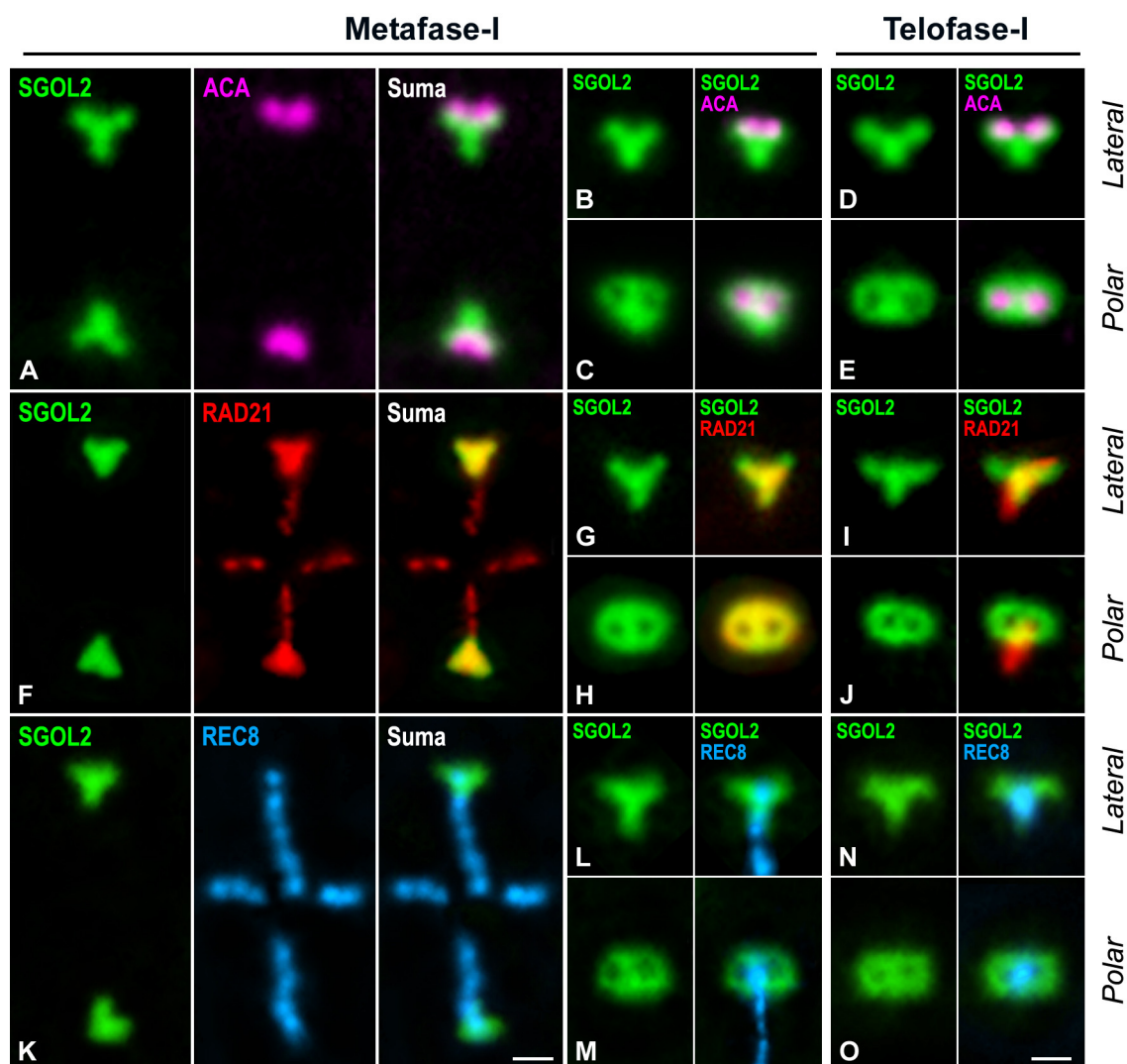
hermanos individualizados son rodeados por el doble anillo de SGOL2 (Fig. 26 E). La colocalización de SGOL2 y RAD21 muestra en las visiones laterales de los centrómeros que RAD21 pasa a tener forma de pequeñas barritas cercanas a los cinetocoros (Fig. 25 P, T y Fig. 26 I). En la visión frontal observamos que las barras de RAD21 generalmente se localizan en el medio del doble anillo de SGOL2 (Fig. 26 J). Si bien la señal en brazos de REC8 se ha perdido en la transición metafase-I/anafase-I, persiste la señal en forma de coma de REC8 hasta telofase-I colocalizando con la parte vertical de la “T” de SGOL2 (Fig. 26 N). En visiones frontales la señal de REC8 se localiza en el centro del doble anillo de SGOL2 (Fig. 26 O).



**Figura 25.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas de la primera división meiótica (columnas primera a tercera). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y



RAD21 (rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas de la primera división meiótica (cuarta columna). (A-D) Diplotena tardía. SGOL2 comienza a detectarse en los centrómeros. El detalle en B muestra a mayor aumento un centrómero en el que se aprecia la señal de SGOL2 que colocaliza parcialmente con la señal de los cinetocoros hermanos. El detalle en D muestra a mayor aumento la colocalización parcial de SGOL2 y RAD21 en el extremo centromérico de los ELs desinapsados. (E-H) Diacinesis. SGOL2 marca unas intensas señales en todos los centrómeros. El detalle en H muestra a mayor aumento la colocalización parcial de SGOL2 y de los cinetocoros en la región centromérica. El detalle en I muestra a mayor aumento la colocalización parcial de SGOL2 y RAD21 en el extremo centromérico de los ELs desinapsados. (I-L) Metafase-I. SGOL2 marca los centrómeros con una señal en forma de "T" justo debajo de los cinetocoros hermanos. La imagen en L muestra la colocalización de SGOL2 y RAD21 en todos los centrómeros de los bivalentes autosómicos y en el centrómero del cromosoma X, mientras que únicamente se observa marcaje de RAD21 en el dominio intercromatídico. Se observa la intensa señal de SGOL2 en el centrómero del cromosoma Y. (M-P) Anafase-I. SGOL2 marca unas señales en forma de "T" en los centrómeros que colocalizan con las señales de RAD21. (Q-T) Telofase-I. SGOL2 marca unas señales en forma de "T" en los centrómeros mientras que RAD21 cambia su conformación a barras. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en T representa 5  $\mu$ m.



**Figura 26.** Dobles inmunolocalizaciones de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, fucsia) (A-E), RAD21 (rojo) (F-J) y REC8 (azul) (K-O). Se muestran detalles a gran aumento de bivalentes autosómicos en metafase-I (A, F, K), así como el detalle de la visión polar y lateral de regiones centroméricas (B, C, G, H, L, M). Se muestran también los detalles de las visiones polares y laterales de las regiones centroméricas de diferentes cromosomas en telofase-I (D, E, I, J, N, O). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. Las barras de medida en K y O representan 5  $\mu$ m.

#### **4.2. Segunda división meiótica**

En intercinesis temprana no encontramos ninguna señal de SGOL2, mientras que como se describió por Parra y col. (2004), RAD21 aparece como barritas cercanas a los cinetocoros en los cromocentros (Fig. 27 A-D). En cambio, en intercinesis tardía volvemos a detectar señales de SGOL2 como aglomerados que colocalizan parcialmente con los cinetocoros (Fig. 27 E-G) pero no con las barritas de RAD21 (Fig. 27 H). En profase-II vemos que esos aglomerados de SGOL2 van adquiriendo progresivamente forma de barra que en algunos casos ya se detectan entre las parejas de cinetocoros hermanos (Fig. 27 I-K), mientras que a partir de esta etapa ya no detectamos ninguna señal de RAD21 (Fig. 27 L, P, T, X). En prometafase-II podemos apreciar como en algunos cromosomas SGOL2 aparece como una barra conectando los dos cinetocoros hermanos mientras que en otros SGOL2 se visualiza como dos puntos por debajo de cada cinetocoro hermano (Fig. 27 M-O). Este cambio conformacional podemos apreciarlo más claramente a más aumento donde se distinguen tres tipos de señales de SGOL2 durante la prometafase-II. La primera consiste en una barra que conecta las parejas de cinetocoros hermanos (Fig. 28 A). La segunda se observa como una estructura intermedia en la cual las barras de SGOL2 se hacen más anchas en sus extremos que en su parte central adquiriendo tales extremos un aspecto más redondeado o incluso adquiriendo forma de dos puntos (Fig. 28 B). Finalmente, aparece una tercera forma en la que SGOL2 ya aparece como dos puntos por debajo de cada cinetocoro hermano (Fig. 28 C). Éste último tipo de señal de SGOL2 se visualiza en visión polar como un anillo rodeando cada cinetocoro hermano (Fig. 28 D). Es interesante comentar también que la señal centromérica de SGOL2 en el cromosoma X en metafase-II tiene un tamaño similar a las que se observan en los autosomas, sin embargo, la señal en el centrómero del cromosoma Y sigue siendo mucho más grande e intensa (Fig. 27 M-O). En metafase-II todas las señales de SGOL2 aparecen como pares de puntos por debajo de cada cinetocoro.

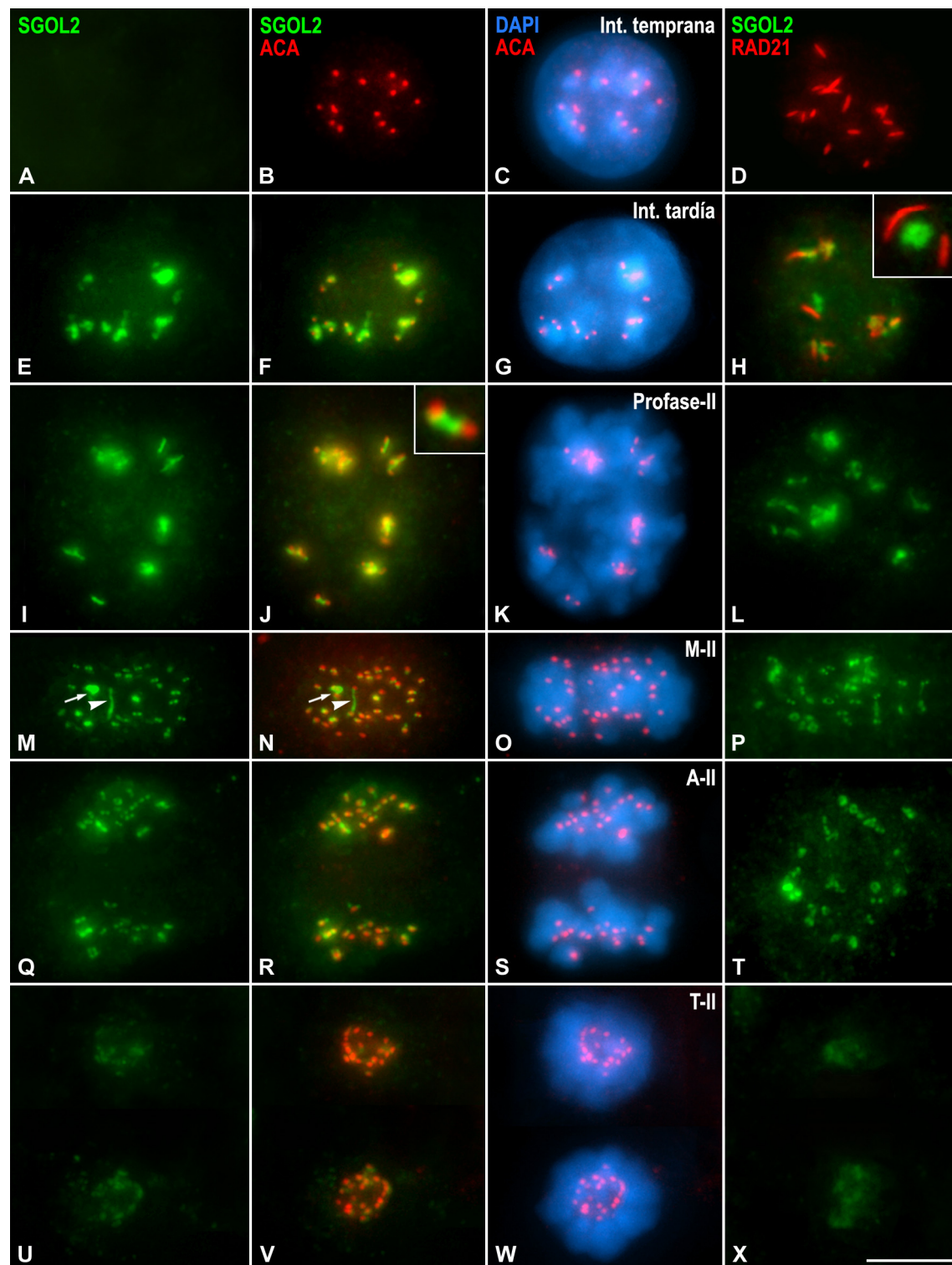
En anafase-II, cuando las cromátidas segregan a polos opuestos, persiste la señal en forma de dos puntos de SGOL2 (Fig. 27 Q-S), que además sigue visualizándose como un anillo rodeando el cinetocoro en visión polar (Fig. 28 E). En telofase-II, la señal de SGOL2 aparece más difusa y menos brillante (Fig. 27 U-W) y los anillos comienzan a desensamblarse (Fig. 28 F).

Dado que nuestros resultados sugieren que SGOL2 podría tener una distribución dependiente de tensión durante la meiosis-II, comprobamos su localización relativa frente a la proteína de *checkpoint* BubR1. Esta proteína es una quinasa que se localiza en los cinetocoros que no están sujetos a tensión, mientras que apenas es detectada en los mismos cuando existe tensión en el centrómero (Taylor y col., 2001). Nuestras observaciones demuestran que SGOL2 aparece en forma de banda cuando los cinetocoros no están enganchados a MTs en prometafase-II, lo cual se refleja por la presencia de una intensa señal de BubR1 en ambos cinetocoros hermanos (Fig. 28 G, H), mientras que cuando la intensidad de la señal de BubR1 disminuye, al igual que su tamaño, reflejo de que los cinetocoros están enganchados a MTs, vemos que SGOL2 está distribuida en forma de dos puntos por debajo de cada cinetocoro (Fig. 28 I).

MCAK es una quinesina despolimerizadora de MTs que está situada en el dominio centromérico interno y que se redistribuye dependiendo de tensión en los cromosomas durante la prometafase-II (Parra y col., 2006) y en la transición prometafase/metafase de la mitosis (McGuinness y col., 2005). Ya que los resultados publicados sobre la distribución de MCAK durante la prometafase-II de machos de ratón (Parra y col., 2006) es muy similar a la que obtuvimos en las inmunolocalizaciones de SGOL2, decidimos analizar la distribución relativa de SGOL2 y MCAK para analizar si colocalizan y si la redistribución de ambas proteínas se produce al tiempo. Nuestros resultados demuestran que SGOL2 y MCAK tienen una localización y redistribución prácticamente idénticas en prometafase-II/metafase-II (Fig. 28 J-L).

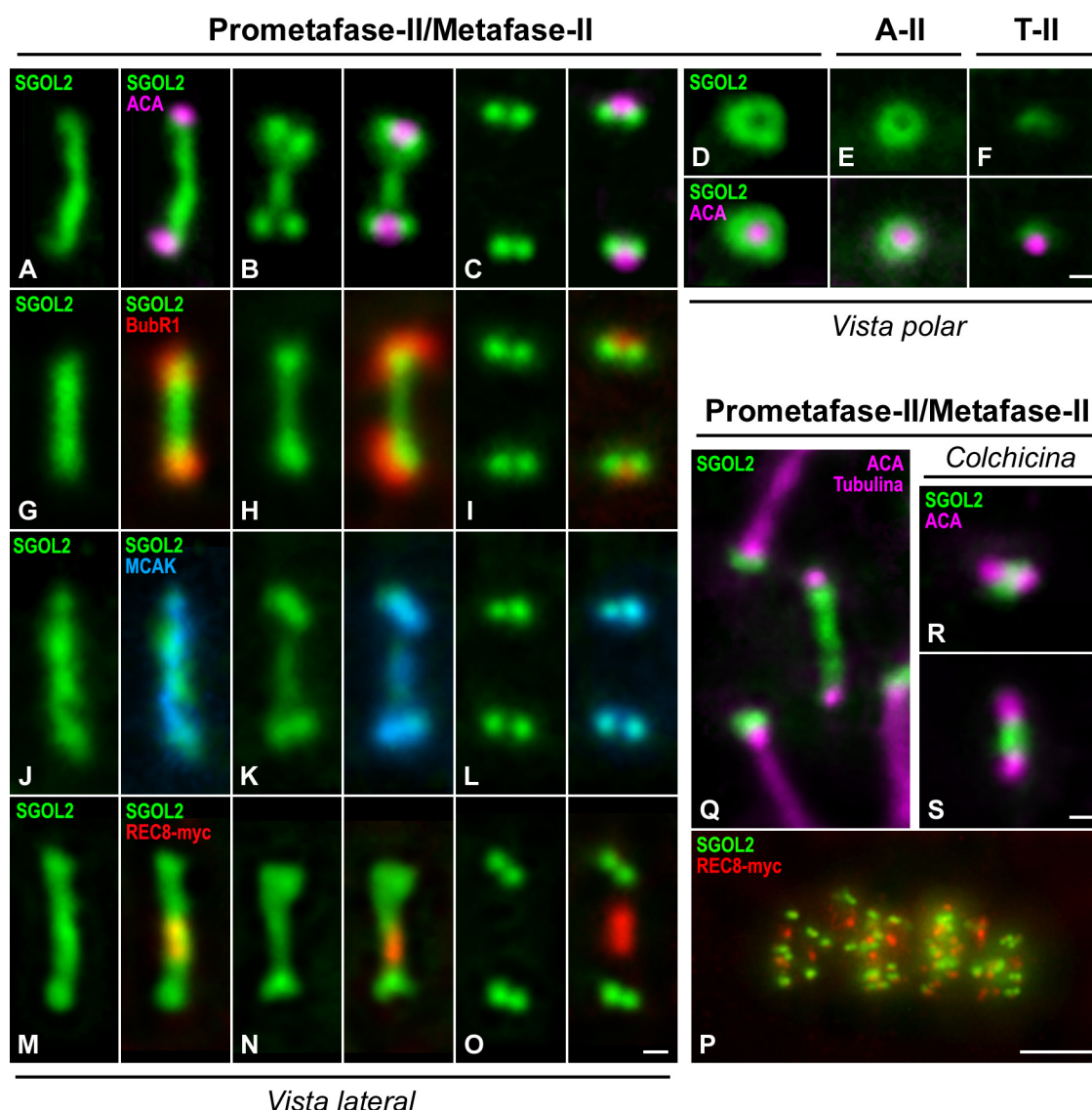
Por otro lado, ya que las Shugoshinas son las proteínas encargadas de proteger los complejos de cohesina centroméricos frente a la Separasa hasta la transición metafase-II/anafase-II, realizamos la doble inmunolocalización de SGOL2 y REC8 (Fig. 28 M-P). En un análisis detallado comprobamos que en los tres tipos de marcaje de SGOL2 podemos observar señal de REC8 en el dominio centromérico interno. La señal de REC8 aparece siempre como un punto sencillo o dos puntos muy juntos en la región intermedia del dominio centromérico interno a una distancia equidistante de ambos cinetocoros hermanos (Fig. 28 M-P), ya sea la señal de SGOL2 en forma de barra entre los cinetocoros (Fig. 28 M), como un par de puntos debajo de cada cinetocoro (Fig. 28 O), o una señal intermedia (Fig. 28 N). Además, en el período de realización de estos experimentos se publicó la distribución relativa de SGOL2 y REC8 en ovocitos de ratón

(Lee y col., 2008) por lo que también resultó muy interesante comparar dichos resultados en espermátocitos de ratón.



**Figura 27.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermátocitos aplastados en intercinesis y en diferentes etapas de la segunda división meiótica (columnas primera a tercera). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Doble inmunolocalización

de SGOL2 (verde) y RAD21 (rojo) en espermátocitos aplastados en intercinesis y en diferentes etapas de la segunda división meiótica (cuarta columna). (A-D) Intercinesis temprana. No se observa marcaje de SGOL2. (E-H) Intercinesis tardía. SGOL2 comienza a aparecer sobre los cromocentros. El detalle en H muestra a mayor aumento las señales en forma de barra de RAD21 frente a la señal redondeada de SGOL2. (I-L) Profase-II. SGOL2 marca señales en los centrómeros que colocalizan parcialmente con los cinetocoros (detalle en J), mientras que no se observa marcaje de RAD21. (M-P) Metafase-II. SGOL2 marca los centrómeros con una señal que puede ser una barra conectando los cinetocoros hermanos o dos puntos localizados bajo cada uno de ellos. No existe marcaje de RAD21. La flechas en M y N indican las señales de SGOL2 en el cromosoma Y, y las cabezas de flecha indican una señal de SGOL2 con forma de barra conectando a los cinetocoros hermanos de uno de los cromosomas. (Q-T) Anafase-II. SGOL2 marca dos pequeñas señales redondeadas localizadas bajo cada cinetocoro. (U-X) Telofase-II. Las señales de SGOL2 se hacen cada vez más difusas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en X representa 5  $\mu$ m.



**Figura 28.** Dobles inmunolocalizaciones de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, fucsia) (A-F), SGOL2 (verde) y BubR1 (rojo) (G-I), SGOL2 (verde) y MCAK (azul) (J-L), y SGOL2 (verde) y REC8-myc (rojo) (M-P). Se muestran detalles a gran aumento de la visión lateral de centrómeros seleccionados en prometafase-II/metáfase-II (A-C, G-I, J-L y M-O), así como el detalle de la visión polar de las regiones centroméricas para la doble inmunolocalización de SGOL2 y de los cinetocoros. (D-F). Se muestran también los detalles de cromosomas seleccionados en los que se ha inmunolocalizado SGOL2 (verde),

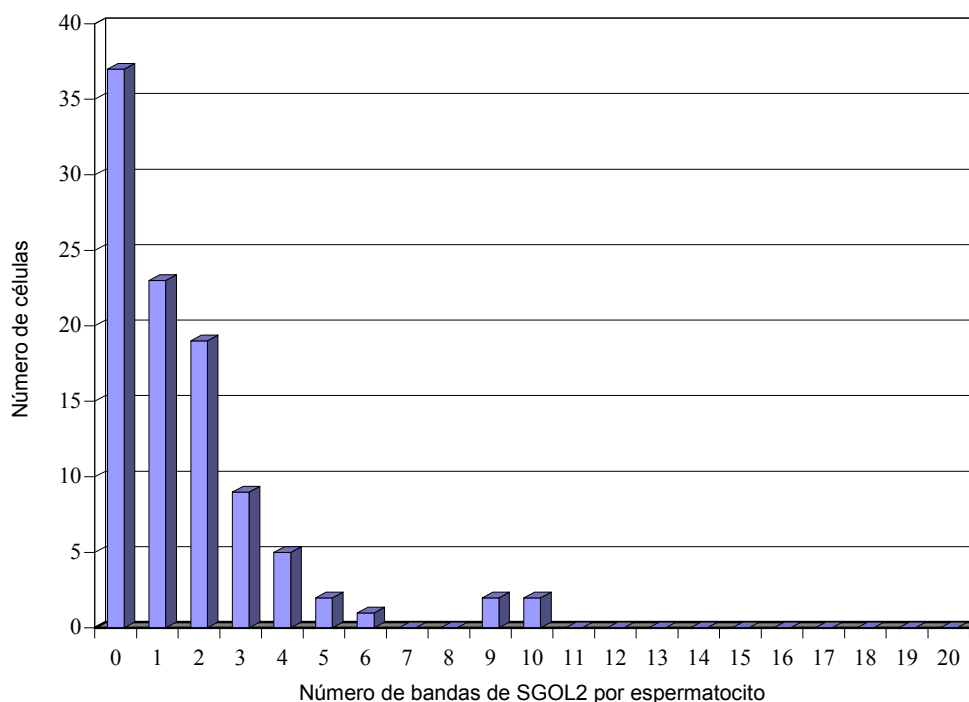


Tubulina (fucsia) y los cinetocoros (ACA, fucsia) (Q) y detalles de las regiones centroméricas de cromosomas tratados con colchicina en prometafase-II/metafase-II (R, S). La imagen P muestra la doble inmunolocalización de SGOL2 y REC8-myc en una prometafase-II/metafase-II. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. Las barras de medida en O y S (A-O, Q-S) representan 1  $\mu$ m y la barra en P representa 3  $\mu$ m.

Por último, y ya que todos los datos previos apuntan a que el cambio en la distribución de SGOL2 durante la prometafase-II es dependiente de tensión, realizamos un último experimento para poder averiguar si la redistribución de SGOL2 desde una barra a dos pares de puntos depende o no de que los cinetocoros estén realmente enganchados a MTs. Procedimos a realizar una triple inmunodetección de SGOL2, los cinetocoros y Tubulina. Pudimos observar que cuando SGOL2 aparece como una barra los cinetocoros hermanos no están enganchados a MTs, mientras que cuando SGOL2 aparece como dos puntos bajo cada cinetocoros hermanos podemos ver haces de MTs enganchando los cinetocoros desde polos opuestos (Fig. 28 Q). Además, para poder comprobar cuál sería la distribución de SGOL2 en ausencia total de MTs realizamos un tratamiento con colchicina, que es una droga despolimerizadora de MTs. En los espermátocitos bloqueados en prometafase-II con colchicina pudimos observar que SGOL2 aparecía siempre como un parche entre los cinetocoros hermanos, que siempre están muy juntos (Fig. 28 R, S). Nunca observamos señales en forma de puntos bajo los cinetocoros en presencia de colchicina.

Como hemos visto, SGOL2 se redistribuye en los centrómeros durante la prometafase-II /metafase-II. Para analizar cuantitativamente este proceso realizamos un conteo del número de centrómeros en los que SGOL2 aparece como una banda en 100 espermátocitos en prometafase-II, siendo por consiguiente el resto de señales centroméricas bien una señal intermedia o bien parejas de puntos (Tabla y Gráfico 5).

<b>Bandas de SGOL2 por célula</b>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11-20
<b>Número de células N=100</b>	37	23	19	9	5	2	1	0	0	2	2	0

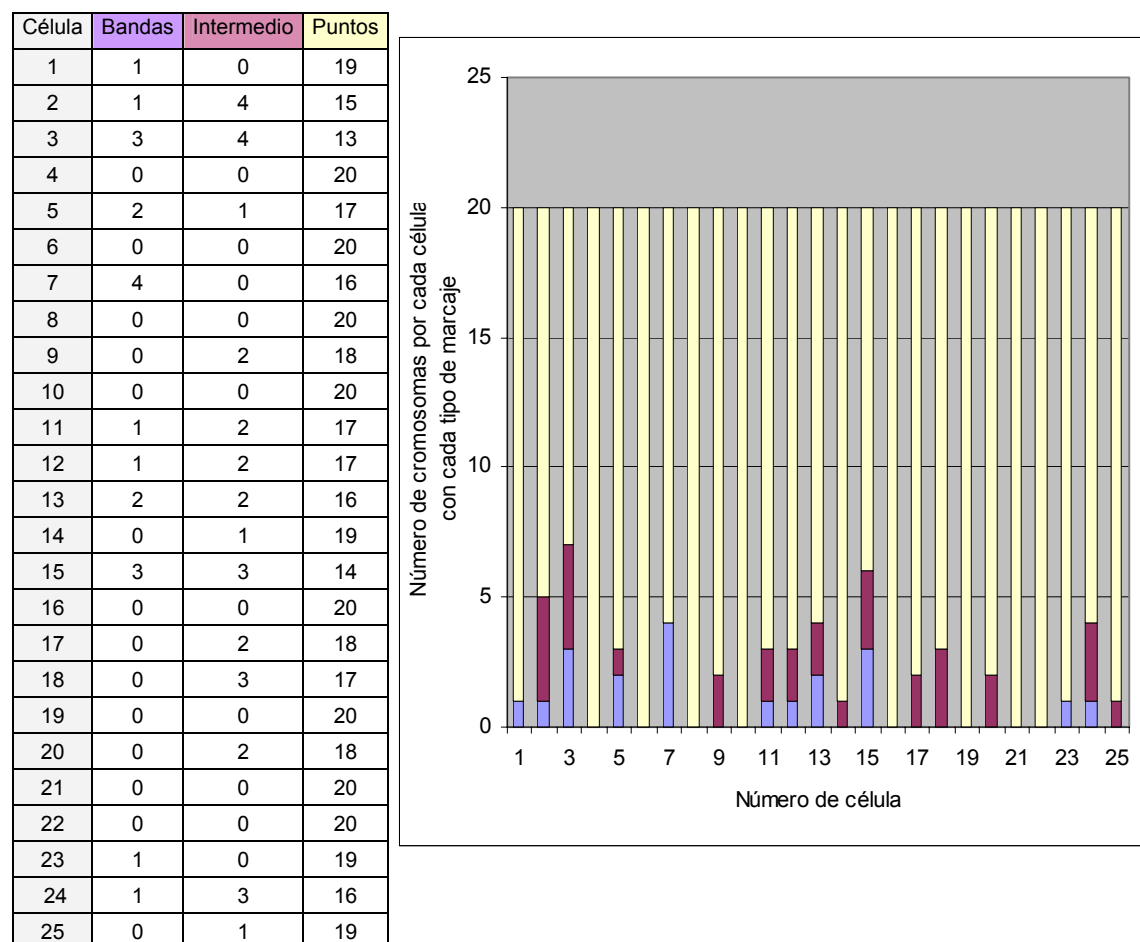


**Tabla y Gráfico 5.** Número de bandas de SGOL2 por espermatozocito en prometafase-II. El Gráfico 5 representa la cantidad de prometafases-II por cada número de bandas de SGOL2 que contienen.

Como podemos observar en el Gráfico 5, lo más frecuente es encontrar prometafases-II que tienen 1, 2 o ninguna banda intercinetocórica de SGOL2. Hay pocas células con un número alto de bandas, se pasa de un número alto (9/10 bandas) a un número menor (5 bandas) muy rápidamente. Estos datos sugieren que cuando empieza la unión a MTs se hace con muchos cromosomas a la vez, de forma que sólo unos pocos cromosomas (1 ó 2) tardan un poco más en adquirir MTs.

Una vez que hemos averiguado que lo más corriente es que las prometafases-II tengan 0, 1 ó 2 bandas de SGOL2 en sus centrómeros, quisimos hacernos una idea de si el cambio de banda a puntos es muy rápido o por el contrario el cambio conformacional pasa mucho tiempo en el estadio intermedio. Para ello decidimos realizar un conteo más específico del número de bandas, el número de marcajes intermedios y el número de marcajes como pares de puntos en 25 espermatozocitos en prometafase-II. Teniendo en cuenta este estudio y los datos expresados en el Gráfico 5 podemos observar que el cambio de la distribución de SGOL2 desde una banda a dos puntos es muy rápido, es decir, que los cromosomas no pasan mucho tiempo con un marcaje en forma de banda

entre los cinetocoro hermanos, y que por otro lado, cuando se dispara el cambio conformacional, éste también es muy rápido y los cromosomas no mantienen mucho tiempo el marcaje intermedio de SGOL2 (ver Tabla y Gráfico 6).



**Tabla y Gráfico 6.** Relación de tipos de marcajes de SGOL2 por célula en espermatocitos en prometáfase-II.

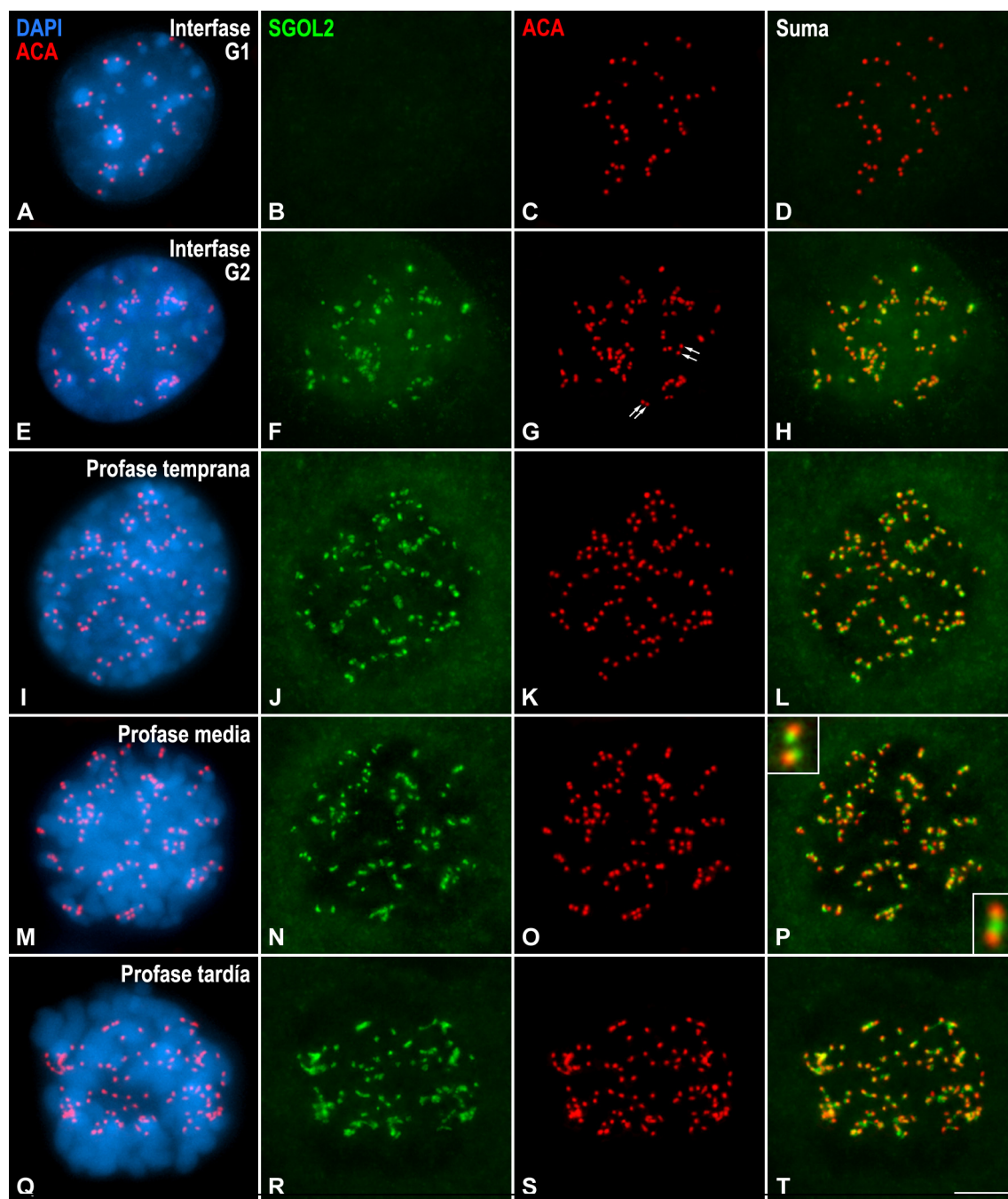
### 4.3. Mitosis

Dado que el comportamiento de los cromosomas meióticos durante la transición metafase-II/anafase-II es similar al de los cromosomas mitóticos en metafase/anafase, decidimos analizar la distribución de SGOL2 en células somáticas para comprobar si en mitosis sufre el mismo cambio conformacional dependiente de tensión que previamente habíamos observado en los espermatocitos secundarios de ratón. Para ello realizamos dobles inmunodetecciones de SGOL2 y los cinetocoros en células de ratón 3T3 y en células humanas HeLa.

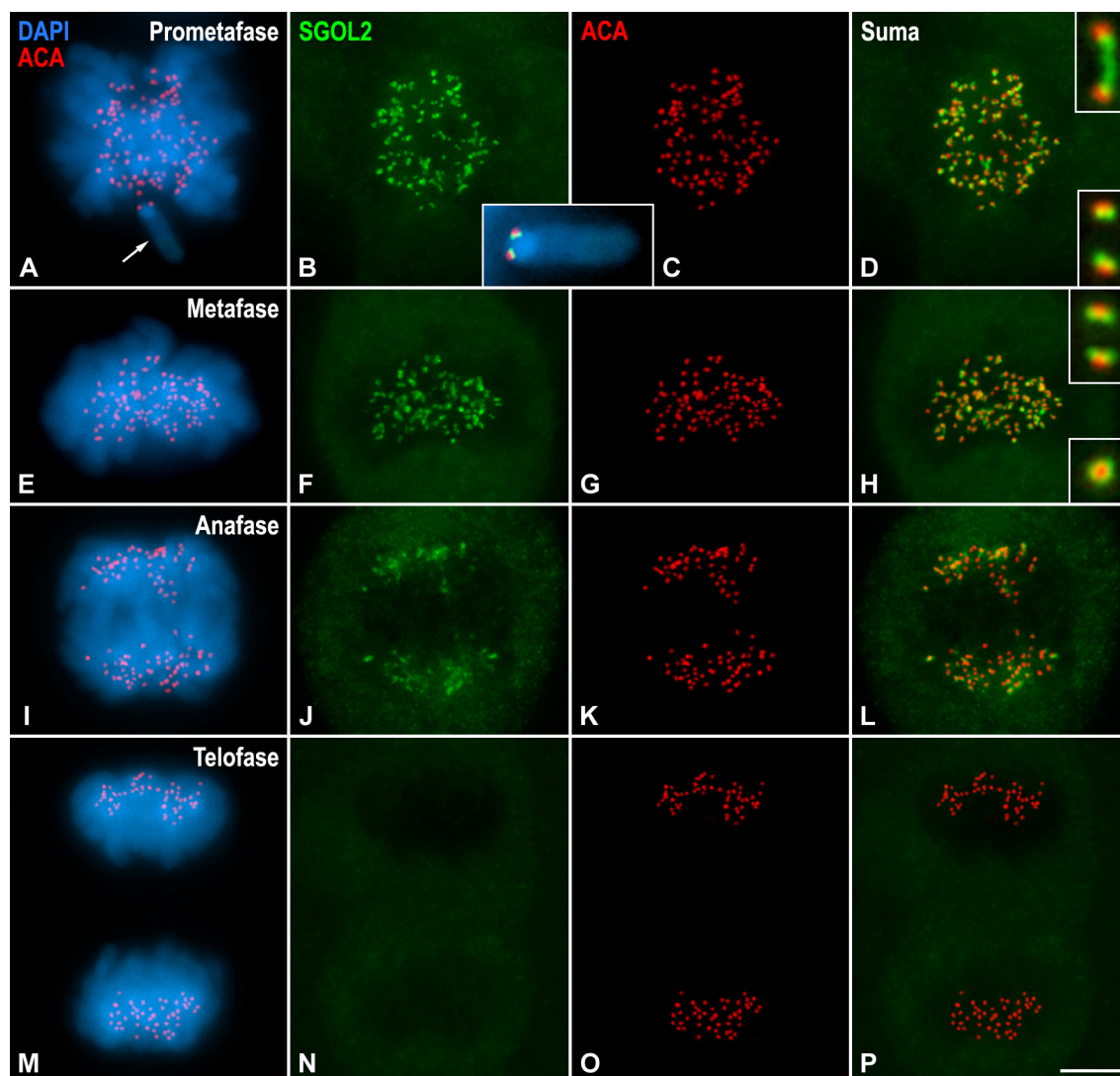


#### 4.3.1. Distribución de SGOL2 en células 3T3 de ratón

En células 3T3 en interfase no existe marcaje de SGOL2 en G1 (Fig. 29 A-D). SGOL2 aparece justo antes de la profase durante la fase G2 en los centrómeros, pero su señal no colocaliza totalmente con los cinetocoros que aparecen formando parejas. En esta fase existe un leve marcaje de SGOL2 también en el nucleoplasma (Fig. 29 E-H). En profase la señal de SGOL2 es ya más definida (Fig. 29 I-T) y podemos observar en algunos cromosomas un parche de SGOL2 entre los cinetocoros hermanos y en otros una señal redondeada de SGOL2 bajo cada cinetocoro (detalles en Fig. 29 P). En prometafase vemos claramente dos tipos de señales de SGOL2: bajo los cinetocoros hermanos o como una barra transversal conectándolos (Fig. 30 A-D). En metafase en cambio todas las señales de SGOL2 aparecen bajo los cinetocoros como dos puntos en visiones laterales de los centrómeros (Fig. 30 E-H). Al igual que ocurría en metafase-II, SGOL2 aparece como un anillo rodeando los cinetocoros en visiones polares de los centrómeros (detalle en Fig. 30 H). Cuando las cromátidas comienzan a segregarse a polos opuestos en anafase las señales de SGOL2 se hacen cada vez más difusas (Fig. 30 I-L). Finalmente en telofase, ya no encontramos señal de SGOL2 en los centrómeros (Fig. 30 M-P).



**Figura 29.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) durante la interfase y la profase mitótica de células 3T3. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Interfase en G1. No existe marcaje de SGOL2. (E-H) Interfase en G2. SGOL2 aparece en los centrómeros, pero su señal no colocaliza totalmente con los cinetocoros. Las flechas en G indican dos parejas de cinetocoros hermanos. (I-L) Profase temprana. SGOL2 marca los centrómeros como señales redondeadas. (M-P) Profase media. En algunos cromosomas SGOL2 aparece como un parche entre los cinetocoros hermanos y en otros como una señal redondeada bajo cada cinetocoro (detalles en P). (Q-T) Profase tardía. Las señales de SGOL2 se hacen cada vez más definidas a medida que aumenta la condensación cromosómica. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en T representa 3 µm.



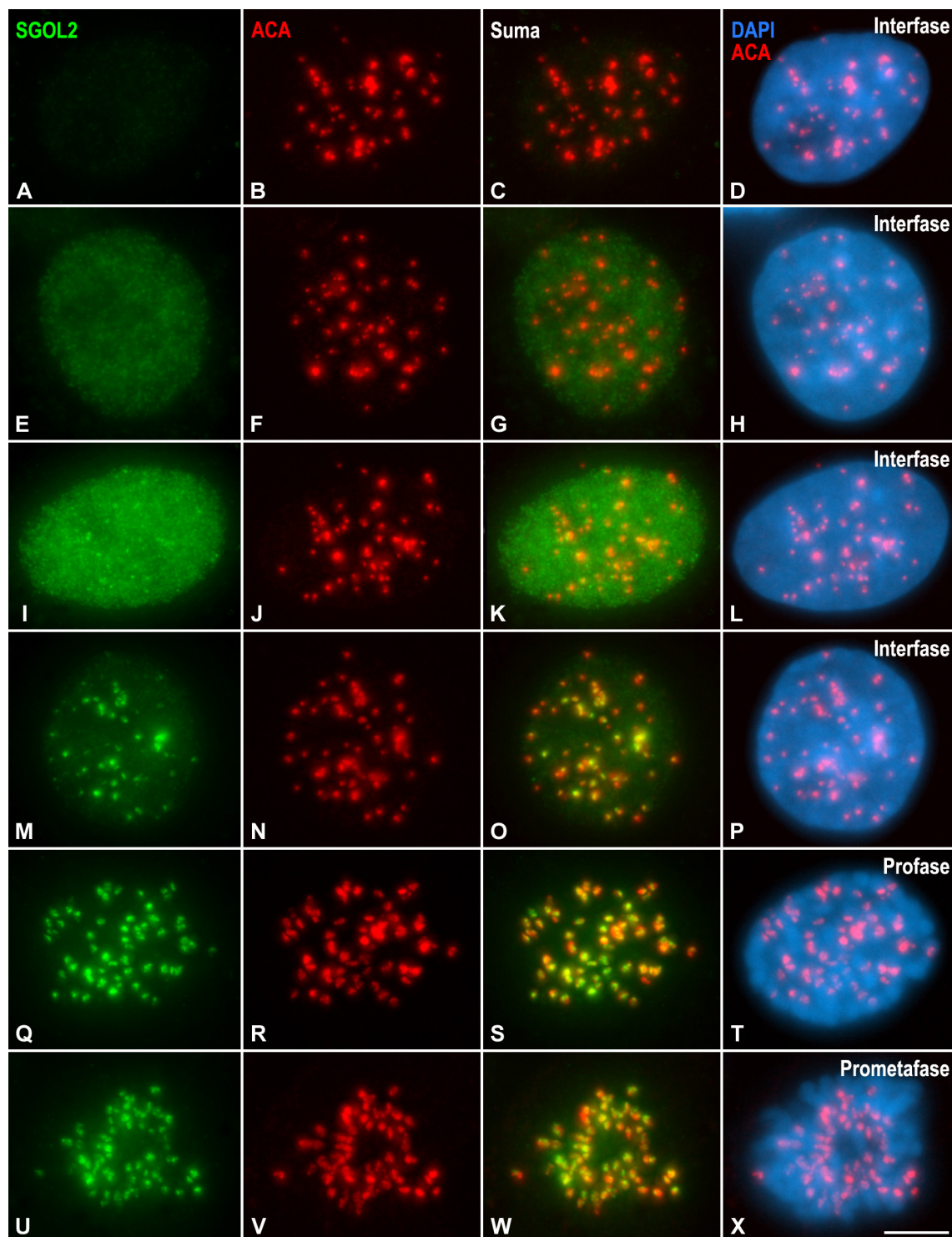
**Figura 30.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) desde prometafase a telofase en células 3T3. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Prometafase. Se observan claramente dos tipos de señales de SGOL2: bajo los cinetocoros hermanos o como una barra que los conecta (detalles en D). El detalle entre B y C muestra a mayor aumento el cromosoma señalado en A. (E-H) Metafase. Todas las señales de SGOL2 aparecen como dos puntos bajo los cinetocoros. Los detalles en H muestran a mayor aumento la visión lateral de SGOL2 como pares de puntos bajo cada cinetocoro, y la visión polar de SGOL2 como un anillo que rodea al cinetocoro. (I-L) Anafase. Las señales de SGOL2 se hacen cada vez más difusas. (M-P) Telofase. No aparece señal de SGOL2 en los centrómeros. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 3  $\mu$ m.

#### **4.3.2. Distribución de SGOL2 en células HeLa humanas**

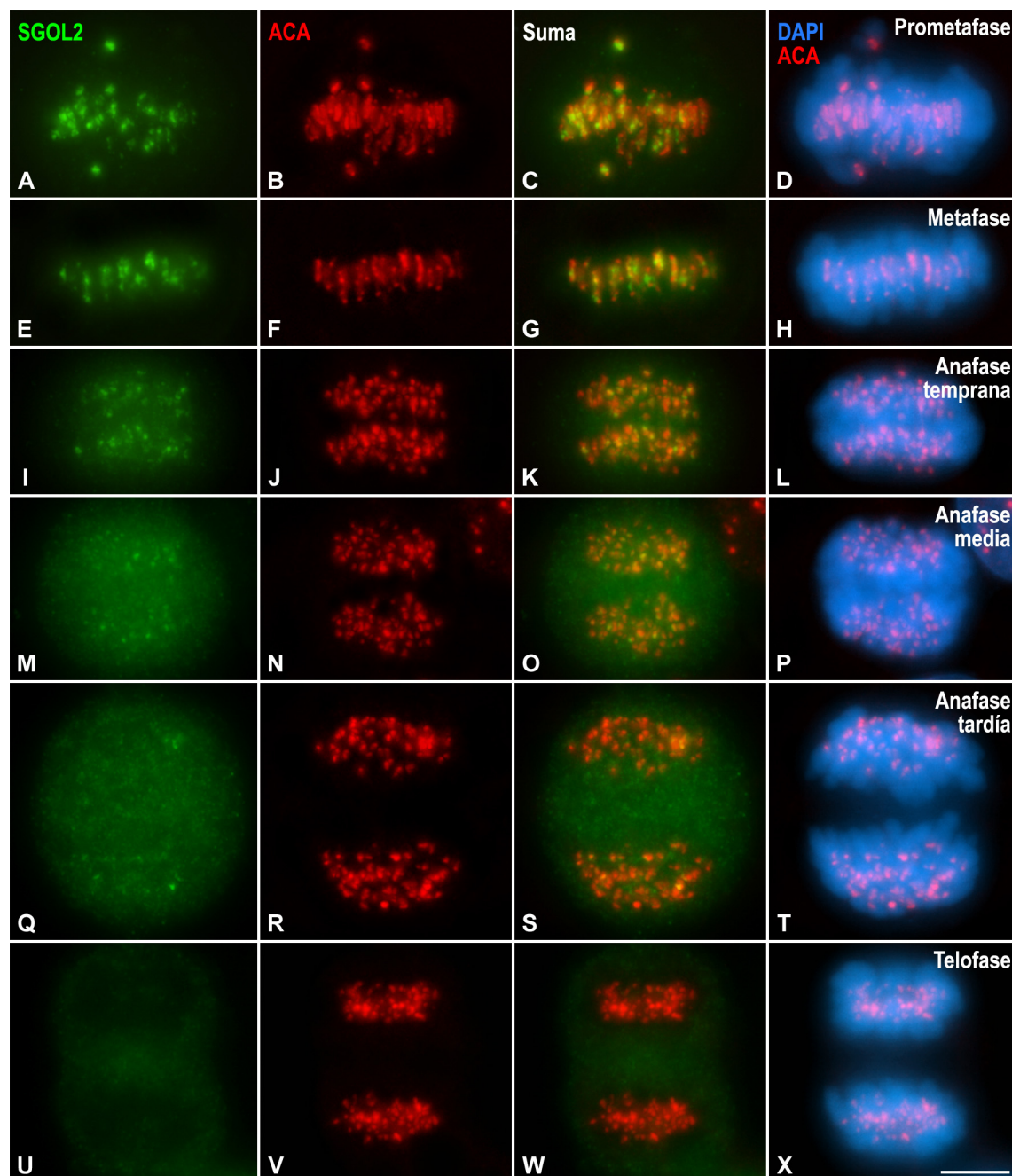
Tras realizar la doble inmunolocalización de SGOL2 y los cinetocoros en células humanas HeLa, pudimos comprobar que el patrón de distribución de SGOL2 que observamos es muy similar al que vimos en las células 3T3. Sin embargo, en células HeLa observamos un marcaje exclusivo en el nucleoplasma al comienzo de la fase G2 de la interfase (Fig. 31 E-H), apareciendo más tarde unas señales más intensas en los centrómeros en G2 tardía (Fig. 31 I-P). Es ya en profase temprana cuando decrece la intensidad del marcaje de SGOL2 en el nucleoplasma y podemos apreciar con más intensidad las señales centroméricas (Fig. 31 Q-T). En prometafase se pueden comenzar a apreciar señales intensas de SGOL2 entre los cinetocoros hermanos (Fig. 31 U-X y 32 A-D) que en metafase aparecen como barras transversales conectando cada pareja de los mismos (Fig. 32 E-H). El patrón de pérdida de SGOL2 de los centrómeros en células HeLa es muy similar al que vimos en células 3T3, según el cual SGOL2 persiste levemente en anafase temprana (Fig. 32 I-L) y se va perdiendo durante la evolución de esta etapa (Fig. 32 M-T) desapareciendo finalmente su marcaje en telofase (Fig. 32 U-X).

En un análisis más detallado, pudimos observar la evolución de la morfología de las señales centroméricas de SGOL2 en cromosomas de células HeLa desde profase a metafase (Fig. 33). Al igual que vimos en la transición prometafase-II/metafase-II, la señal de SGOL2 pasa de ser un parche entre los cinetocoros hermanos, a ser una barra que los conecta durante la congregación cromosómica, y finalmente se convierte en un par de señales justo debajo de los mismos cuando los cromosomas ya están alineados en la placa metafásica (Fig. 33 A-G).

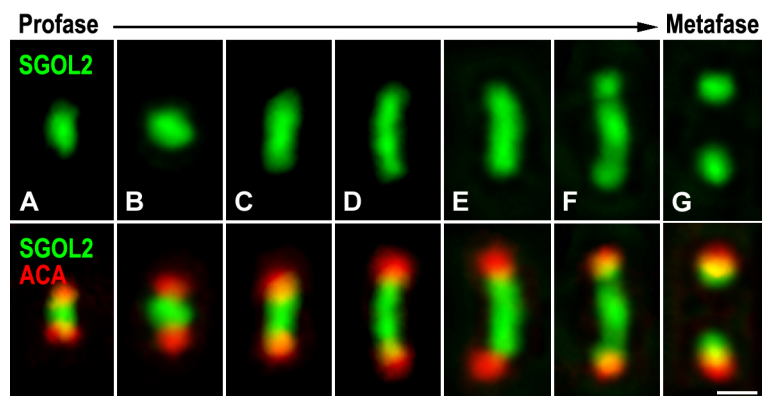




**Figura 31.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) durante la interfase y la profase mitótica de células HeLa. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Interfase. No aparece marcaje de SGOL2. (E-L) Interfase. Se observa un marcaje exclusivo en el nucleoplasma. (M-P) Interfase. Se observan unas señales más intensas en los centrómeros. (Q-T) Profase. Decrece la intensidad del marcaje de SGOL2 en el nucleoplasma y podemos apreciar con más intensidad las señales centroméricas. (U-X) Prometáfase. Las señales de SGOL2 se hacen más grandes e intensas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en X representa 5 µm.



**Figura 32.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) desde la prometáfase a telofase en células HeLa. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-H) Prometáfase y metafase. SGOL2 aparece como intensas señales que colocalizan parcialmente con los cinetocoros hermanos. (I-T) Anafase. Las señales de SGOL2 se hacen cada vez más difusas a medida que aumenta el marcaje en el citoplasma. (U-X) Telofase. No se observa marcaje de SGOL2 en los centrómeros. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en X representa 3  $\mu$ m.



**Figura 33.** Detalles a gran aumento de la doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en los centrómeros desde la profase a la metafase en células HeLa. La señal de SGOL2 cambia progresivamente desde una señal con forma de barra que conecta a los cinetocoros hermanos a un punto localizado bajo cada cinetocoro. La barra de medida en G representa 0,5  $\mu\text{m}$ .

## 5. Estudio del modelo de ratón mutante para *sgol2*

La generación y estudio de ratones *knockout* (KO) con pérdida de función de alguna proteína esencial para el correcto desarrollo de la meiosis proporciona información y nuevos puntos de vista referentes a la estructura y dinámica del cromosoma meiótico.

Para nuestro caso concreto establecimos una colaboración con el Dr. Alberto Pendás del Centro del Investigación del Cáncer (CIC) en Salamanca, cuyo grupo investigador generó el mutante para la proteína protectora de la cohesión centromérica SGOL2, cuyo análisis citológico de la meiosis fue llevado a cabo por nuestro grupo.

### 5.1. Análisis de la meiosis en ratones macho *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Los ratones mutantes para SGOL2 se generaron tal y como se detalla en el trabajo de investigación de Llano y col. (2008).

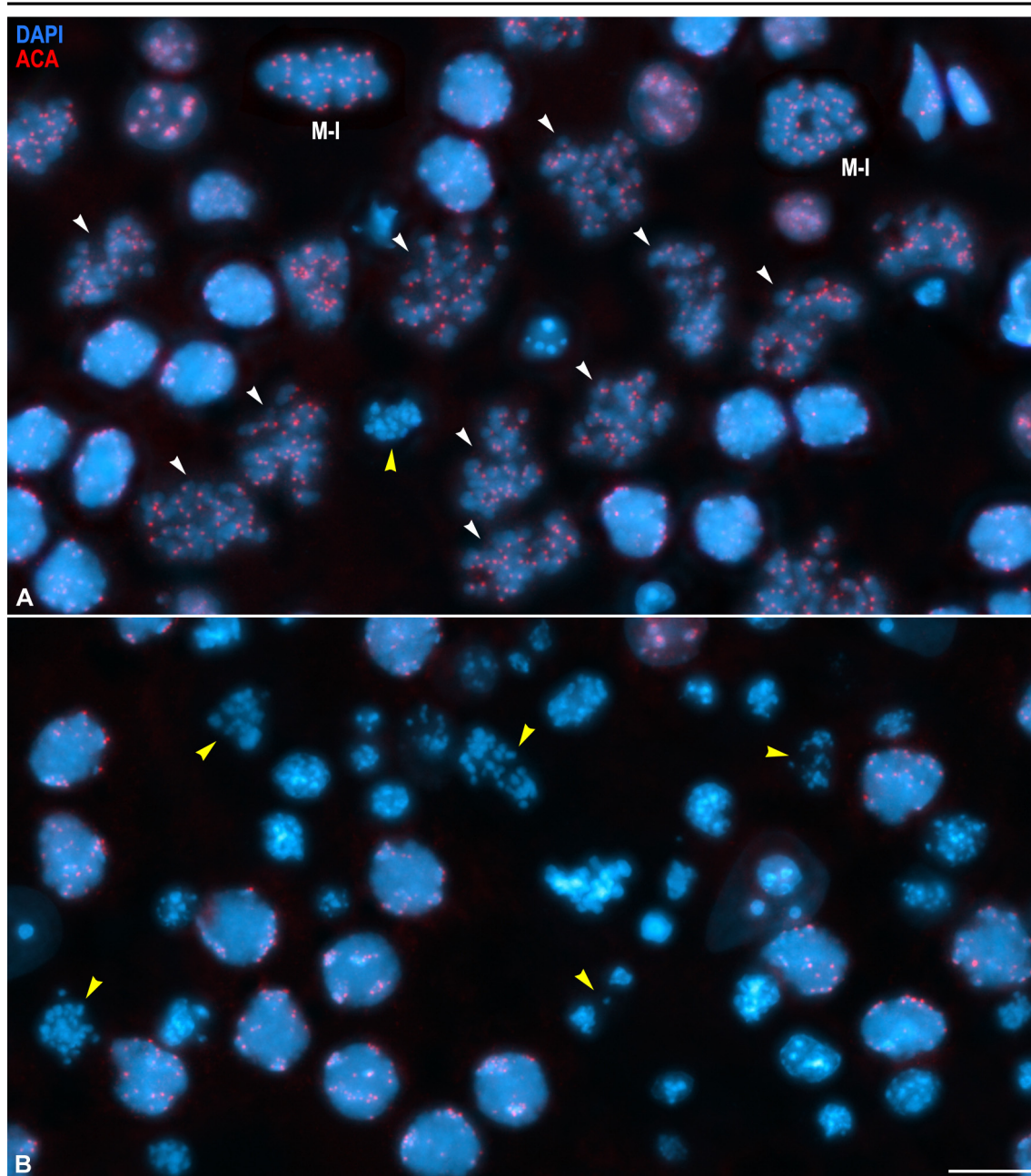
Aunque en dicho trabajo se analizaron los fenotipos meióticos tanto de machos como de hembras, nosotros procedimos únicamente al análisis de los individuos macho tanto heterocigotos como homocigotos. Los individuos heterocigotos son fértiles y absolutamente normales, y así lo comprobamos con la inmunolocalización de SGOL2 así como de diversas proteínas cuyo ciclo es bien conocido como SYCP3 (imágenes no mostradas). Los ratones mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> tiene un desarrollo embrionario y postnatal normal, pero la ausencia de SGOL2 acarrea severas alteraciones que conllevan a la infertilidad, ya que ninguno de los machos o hembras mutantes dejaron descendencia al ser cruzados con individuos normales. El estudio de la mitosis en ausencia de SGOL2



en células MEFs, así como los estudios histopatológicos tanto en ovario como en testículo fueron realizados por el equipo del Dr. Pendás (Llano y col., 2008).

En un primer estudio a bajo aumento de los aplastados de túbulos seminíferos de los individuos mutantes para SGOL2, marcados para detectar los cinetocoros y teñidos con DAPI, apreciamos que aparecen multitud de espermatoцитos bloqueados en metafase-II y además altos niveles de apoptosis (Fig. 34).

#### SGOL2 -/-



**Figura 34.** Inmunolocalización de los cinetocoros (ACA, rojo) y contratinción de la cromatina con DAPI (azul) en una imagen a pequeño aumento de aplastados de espermatoцитos del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Se indican con cabezas de flecha blancas las “metaphase-II like” y con cabezas de flecha amarillas las divisiones apoptóticas. Las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en B representa 10  $\mu$ m.

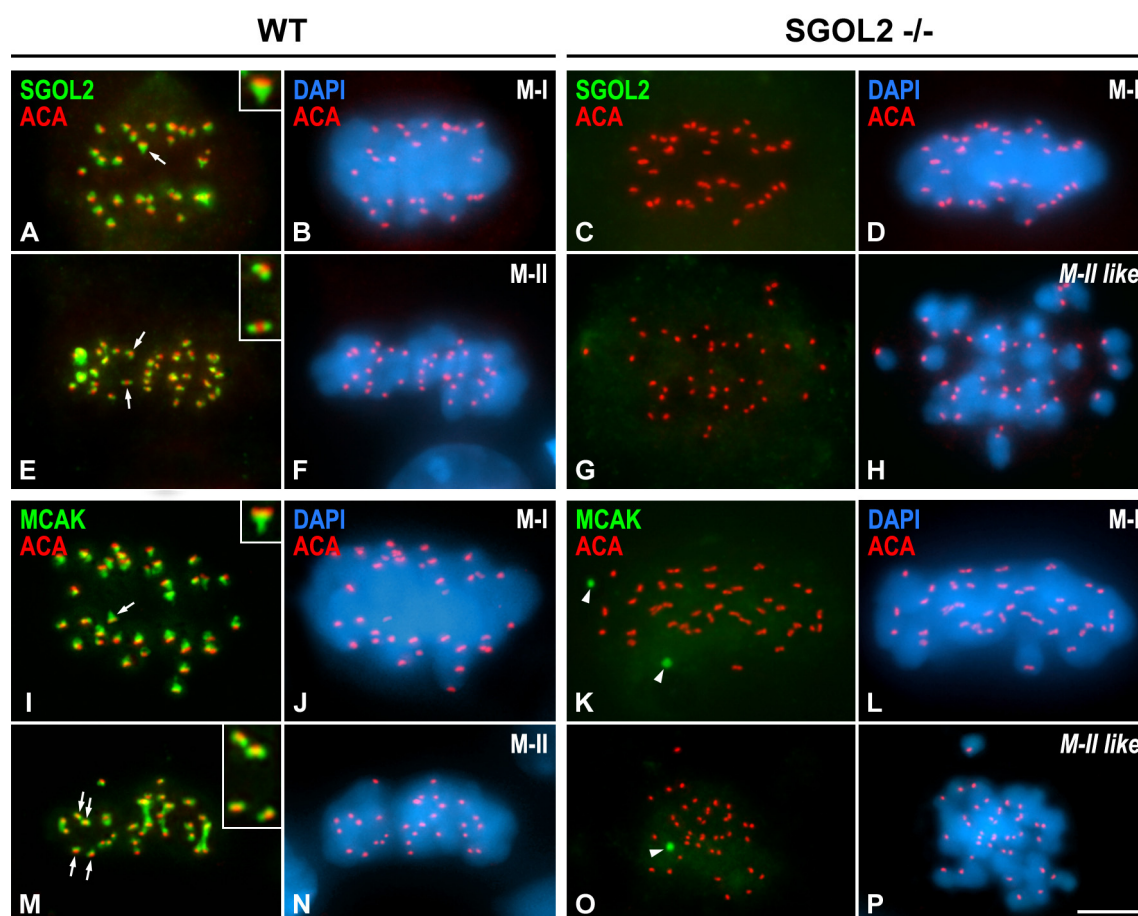


Para examinar con detalle qué fallos meióticos llevan a provocar la infertilidad en los individuos mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> realizamos diversas detecciones mediante inmunofluorescencia indirecta para detectar distintas proteínas sobre aplastados de túbulos seminíferos. En primer lugar realizamos una doble inmunodetección de SGOL2 y cinetocoros en los individuos mutantes para verificar la ausencia de la proteína. Así, podemos ver en metafase-I que mientras que en individuos normales (*Wild Type*, WT) SGOL2 se localiza en el dominio centromérico interno (Fig. 35 A, B), no observamos marcaje de SGOL2 en el individuo mutante, aunque la morfología, condensación y alineamiento cromosómicos son aparentemente normales (Fig. 35 C, D). En metafase-II, mientras que observamos las señales centroméricas de SGOL2 en individuos normales (Fig. 35 E, F), vemos que en los individuos mutantes no sólo no existe marcaje de SGOL2, sino que además las dos cromátidas de cada cromosoma no se encuentran unidas por la regiones centroméricas, sino que están todas ellas sueltas. Esto lo podemos comprobar puesto que pueden contarse 40 señales cinetocóricas, una por cada cromátida suelta. Además, todas estas cromátidas sueltas no congregan en una placa ecuatorial clásica sino que se encuentran aleatoriamente dispersas en el citoplasma (Fig. 35 G, H).

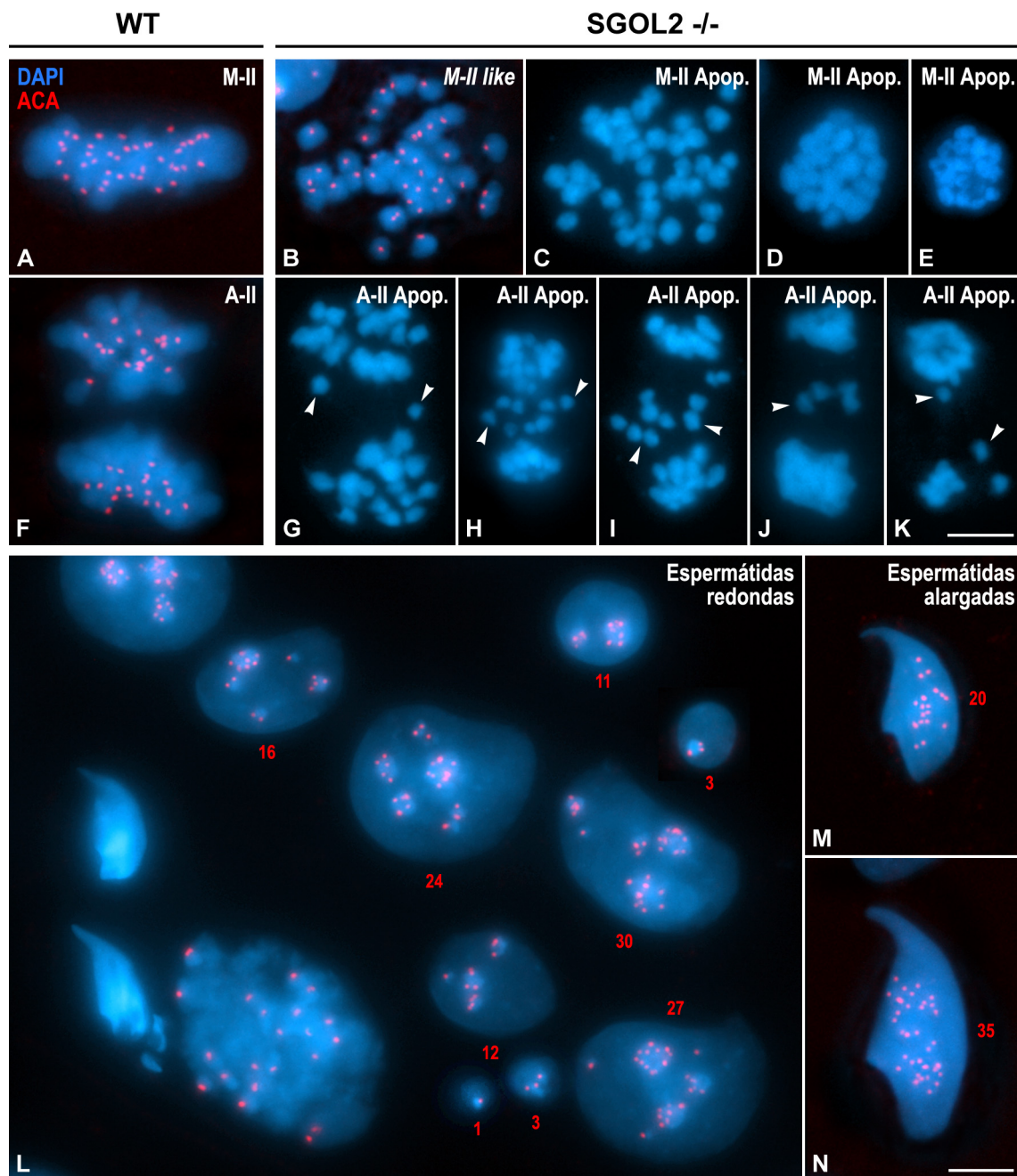
Por otro lado, ya que se ha descrito que se necesita SGOL2 para el ensamblaje de MCAK a los centrómeros (Huang y col., 2007), realizamos la inmunodetección de MCAK en espermatoцитos del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Pudimos comprobar que en los individuos normales, MCAK se localiza en el dominio centromérico interno en metafase-I (Fig. 35 I, J) y bajo los cinetocoros en metafase-II (Fig. 35 M, N), tal y como hemos descrito previamente (Parra y col., 2006). Sin embargo, MCAK no es detectada en los centrómeros ni en metafase-I (Fig. 35 K, L) ni en metafase-II (Fig. 35 O, P) en los individuos mutantes. Únicamente pudimos detectar aglomerados de MCAK dispersos en el citoplasma tanto en metafase-I como en metafase-II en los individuos mutantes (Fig. 35 K, L y O, P).

A los espermatoцитos mutantes en metafase-II en los que todas las cromátidas están sueltas y no se alinean en una placa ecuatorial les llamaremos a partir de ahora “*metaphase-II like*” (“espermatoцитos parecidos a metafase-II”) (Fig. 36 B). Las “*metaphase-II like*” nunca progresan a las canónicamente establecidas anafases-II, sino que podemos observar que existen multitud de células en ese estadio de bloqueo, cuyas cromátidas presumiblemente están intentando biorientar. La dificultad para biorientar cromátidas sueltas en “*metaphase-II like*” da como resultado bien células con todas las

cromátidas sueltas en estado de apoptosis, en las cuales generalmente ya no se marcan los cinetocoros (Fig. 36 C-E), o bien células en una “*anaphase-II like*” apoptóticas con dos polos más o menos definidos y con multitud de cromátidas sueltas retrasadas (Fig. 36 G-K). Por lo tanto, con estas observaciones la explicación más plausible a la infertilidad de los individuos KO para SGOL2 es la pérdida prematura de la cohesión centromérica que da lugar a espermátocitos infértiles en metafase-II cuyos cromosomas poseen todas las cromátidas sueltas.



**Figura 35.** Doble inmunolocalización de SGOL2 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermátocitos aplastados en metafase-I, metafase-II y “*metaphase-II like*” en un individuo WT (normal) y en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. (A-H). Doble inmunolocalización de MCAK (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en un individuo WT y en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> durante la metafase-I, metafase-II y “*metaphase-II like*” (I-P). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) Metafase-I de WT. La flecha en A indica la señal de SGOL2 en forma de “T” en un centrómero, la cual se muestra ampliada en el detalle. (E, F) Metafase-II de WT. Las flechas en E indican la señal de SGOL2 como dos puntos bajo cada cinetocoro hermano, la cual se muestra ampliada en el detalle. (I, J) Metafase-I de WT. La flecha en I indica la señal de MCAK en forma de “T” en un centrómero, la cual se muestra ampliada en el detalle. (M, N) Metafase-II de WT. Las flechas en M indican la señal de MCAK como dos puntos bajo cada cinetocoro hermano, las cuales se muestran ampliadas en el detalle. (C-H) No existe marcaje de SGOL2 ni en metafase-I ni en “*metaphase-II like*” en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. (K-L) Metafase-I del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. No aparece marcaje de MCAK en los centrómeros. Las cabezas de flecha indican los aglomerados de MCAK que aparecen en el citoplasma. (O, P) “*Metaphase-II like*” del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. No aparece marcaje de MCAK en los centrómeros. La cabeza de flecha indica un aglomerado de MCAK en el citoplasma. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.



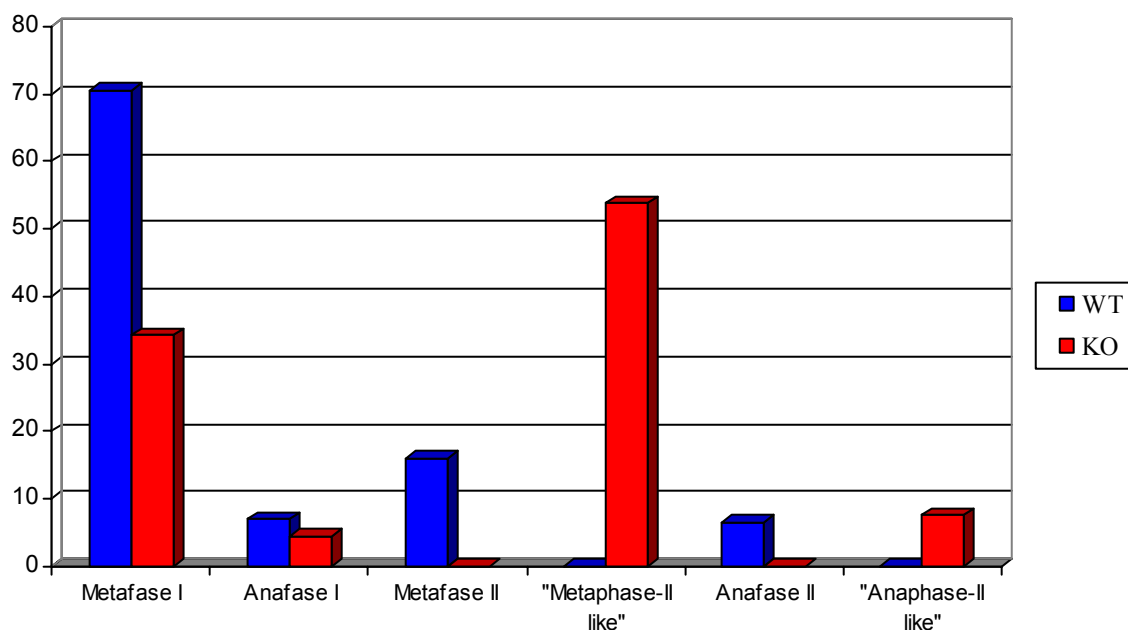
**Figura 36.** Inmunolocalización de los cinetocoros (ACA, rojo) y contratinción de la cromatina con DAPI (azul) en espermatocitos aplastados en metafase-II (A) y anafase-II (F) de un individuo WT y en “*metaphase-II like*” (B-E) y “*anaphase-II like*” (G-K) apoptóticas del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. No se detecta marcaje de los cinetocoros en las células apoptóticas. (G-K) “*Anaphase-II like*” apoptóticas del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Las cabezas de flecha indican cromátidas sueltas que aparecen en la zona media del huso de las células. (L, N) Espermatidas del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. (M) Espermatida alargada normal de un individuo WT. Se indica en rojo el número de cinetocoros que aparecen en cada espermatida. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en K representa 5  $\mu$ m y la barra de medida en N representa 2,5  $\mu$ m.

Para realizar un estudio del número de espermatocitos en división que encontramos en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> con respecto a los individuos normales, hemos realizado conteos del número de espermatocitos en cada etapa especificando además en

cada una de ellas cuántas células se encontraban en estado normal, y cuántas estaban en procesos degenerativos o de apoptosis, las cuales denominaremos como “degeneradas”. Podemos suponer que estas células se encuentran en procesos de muerte celular programada ya que el equipo del Dr. Pendás realizó pruebas de ensayo TUNEL en cortes de túbulos seminíferos de individuos KO comparándolos con los niveles de apoptosis en individuos WT, encontrando que dichos niveles eran mucho mayores en los individuos mutantes (Llano y col., 2008). El conteo del número de espermatoцитos en cada etapa se realizó en dos individuos normales (WT) y en dos individuos mutantes (*Sgol2*<sup>-/-</sup>). Los datos obtenidos se resumen en la Tabla y Gráfico 7.

Como podemos analizar en la Tabla y Gráfico 7, hay muchas menos metafases-I en los individuos mutantes (KO) que en los normales (WT), y alrededor de un 10% más de ellas están degeneradas. Lo mismo ocurre para las anafases-I, ya que hay menos en los individuos mutantes, pero a su vez un mayor porcentaje está entrando en apoptosis. Sin embargo, la máxima diferencia se centra en los porcentajes de las metafases-II de individuos normales y las “*metaphase-II like*” de los individuos mutantes. En individuos WT todas las metafases-II son normales, pero en los individuos KO el 100% de ellas tienen todas sus cromátidas sueltas, y casi el 20% de ellas degenera. Del resto, las que llegan a “*anaphase-II like*”, sufren casi el 98% de ellas apoptosis frente a solamente un 10% en las anafases-II normales de individuos WT.

Etapa	Tipo	WT			<i>Sgol2</i> <sup>-/-</sup>		
		N	% dentro de cada etapa	% de cada etapa	N	% dentro de cada etapa	% de cada etapa
Metafase-I	Normal	597	88.3	70.5	434	79.9	34.2
	Degenerada	79	11.7		109	20.1	
Anafase-I	Normal	63	94	7	59	84.3	4.4
	Degenerada	4	6		11	15.7	
Metafase-II	Normal	133	86.4	16	0	0	53.8
	Degenerada	21	13.6		165	19.3	
	“ <i>Metaphase-II like</i> ”	0	0		688	80.7	
Anafase-II	Normal	56	90.3	6.5	0	0	7.6
	Degenerada	6	9.7		118	97.5	
	“ <i>Anaphase-II like</i> ”	0	0		3	2.5	
Total		959		100	1587		100

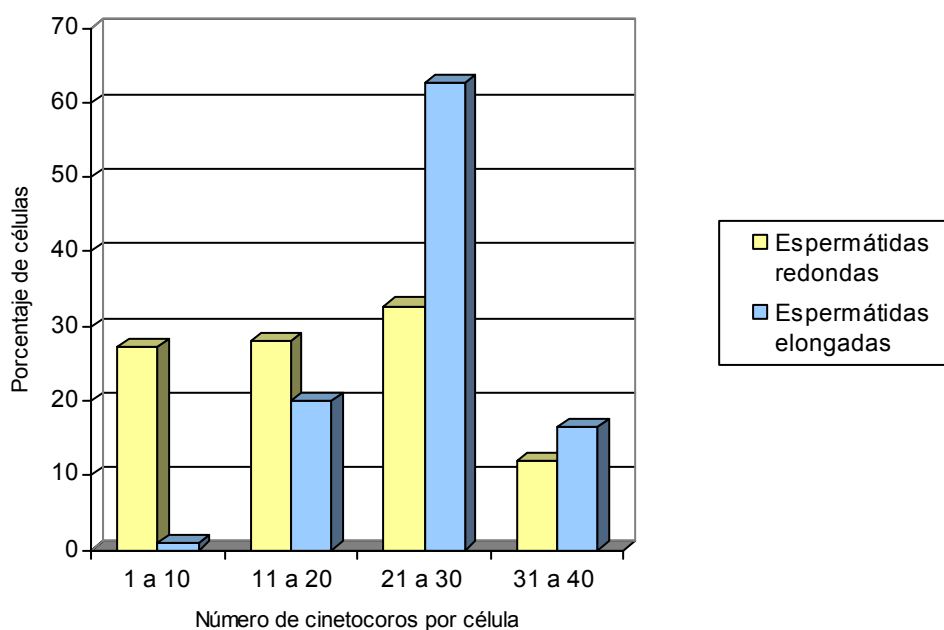


**Tabla y Gráfico 7.** Número de células en etapas de las dos divisiones meióticas en individuos WT y *Sgo12<sup>-/-</sup>*.

Por otro lado, también centramos nuestra atención en las espermatidas, ya que los individuos mutantes no son estériles sino infértiles, y sí pueden observarse espermatidas en diferentes estados de maduración en ellos. Es interesante comentar en este punto que el equipo del Dr. Pendás en Salamanca realizó pruebas de cuantificación de espermatozoides y detectó un descenso del 40% en el espermatozoide de los individuos KO (Llano y col., 2008). Presumiblemente, esas espermatidas o bien entran en procesos de apoptosis o sufren malformaciones que las hacen incapaces de fecundar un óvulo. Cuando inmunodetectamos los cinetocoros en las espermatidas de los individuos KO encontradas, podemos observar que existen espermatidas redondeadas que poseen desde 1 hasta casi 40 señales (Fig. 36 L). También encontramos espermatidas elongadas con los núcleos con la característica forma de hoz con números aberrantes de señales cinetocóricas, y además con un tamaño de núcleo mayor (Fig. 36 N) comparadas con las observadas en individuos WT (Fig. 36 M), las cuales como es lógico, tienen 20 señales cinetocóricas. Para comprobar cuantitativamente este fenómeno realizamos conteos del número de cinetocoros en 150 espermatidas redondeadas y 110 elongadas en los individuos KO. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla y Gráfico 8.



Número de cinetocoros	Espermátidas redondas		Espermátidas elongadas	
	n	%	n	%
1-10	41	27.3	1	0.9
11-20	42	28	22	20
21-30	49	32.7	69	62.7
31-40	18	12	18	16.4
Total	150	100	110	100



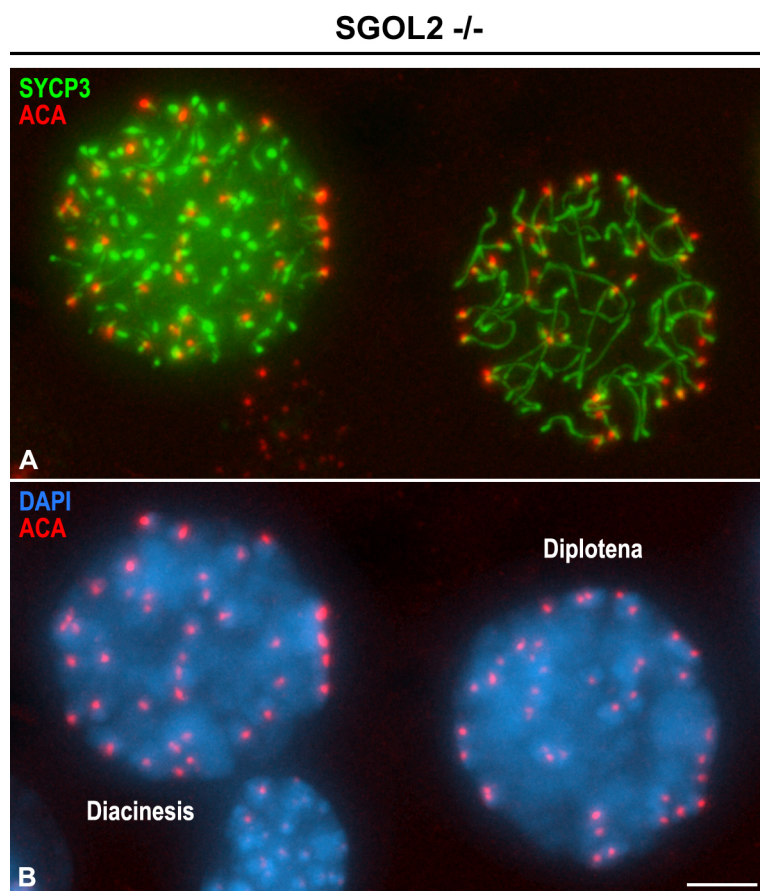
**Tabla y Gráfico 8.** Número de cinetocoros en espermátidas redondas y elongadas en individuos *Sgo12<sup>-/-</sup>*.

Como podemos observar en el Gráfico 8, a diferencia de lo que ocurre en individuos normales (WT), en los que todas las espermátidas tienen 20 señales cinetocóricas, en los individuos *Sgo12<sup>-/-</sup>* aparecen espermátidas con un número de cinetocoros variable desde 1 a 40. En las etapas más tempranas de la espermiogénesis de los individuos mutantes podemos encontrar espermátidas redondas que poseen desde 1 a 40 cinetocoros. Es interesante destacar que existe un reparto bastante equitativo entre los grupos de espermátidas redondas que tienen de 1 a 10, de 11 a 20 y de 21 a 30 señales cinetocóricas, siendo el grupo con menos representación el que tiene de 31 a 40. Sin embargo, en etapas posteriores de maduración encontramos espermátidas elongadas que rara vez poseen de entre 1 y 10 señales cinetocóricas, siendo el grupo más mayoritario aquel en que encontramos de 21 a 30 señales.

## 5.2. Dinámica de la proteína SYCP3 en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Ya que hay varios mutantes con defectos meióticos en los que se ve alterado el CS, decidimos examinar el patrón de distribución de SYCP3 en los individuos KO para SGOL2 mediante inmunofluorescencia indirecta.

Los individuos mutantes para SGOL2 tienen una profase-I normal tanto en cuanto a progresión y duración de las etapas como en cuanto a la estructura y condensación de la cromatina. Tras realizar la doble inmunolocalización de SYCP3 junto a los cinetocoros en individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> pudimos observar que la localización de SYCP3 durante la profase-I es totalmente normal, es decir, sobre los EAs/ELs del CS. Se muestran como ejemplo dos espermatoцитos en diplotena y diacinesis (Fig. 37) en los que SYCP3 tiene un marcaje normal. Esto significa que SGOL2 no es necesaria para los procesos de apareamiento y sinapsis. El patrón de distribución de SYCP3 y su dinámica durante la profase-I en los individuos mutantes no es sorprendente puesto que en individuos normales SGOL2 empieza a aparecer exclusivamente en los centrómeros a partir de diplotena (Gómez y col., 2007).



**Figura 37.**

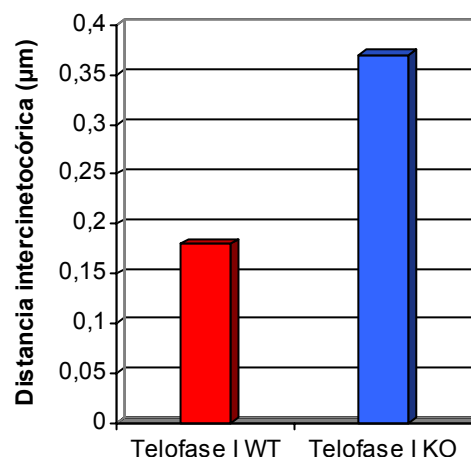
Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatoцитos aplastados durante diplotena y diacinesis en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). SYCP3 marca los ELs sinapsados y desinapsados en diplotena. En diacinesis SYCP3 marca levemente los ELs desinapsados e intensamente los engrosamientos sobre los mismos. Ambas imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en B representa 5  $\mu$ m.

Sin embargo, la distribución de SYCP3 en metafase-I sí que se ve alterada en ausencia de SGOL2. Aunque los bivalentes se encuentran bien orientados en la placa ecuatorial, la distribución de SYCP3 se ve alterada en la región centromérica. Como hemos comentado en apartados anteriores, en individuos normales (WT), SYCP3 se localiza en metafase-I a modo de “T” en el dominio centromérico interno justo por debajo de los cinetocoros hermanos que están íntimamente asociados, y además como parches a lo largo del dominio intercromatídico (Fig. 38 A, B). En anafase-I, SYCP3 se pierde en este último dominio pero se mantiene la señal en “T” en el centrómero (Fig. 38 E, F). La señal centromérica de SYCP3 se transforma en barritas cercanas o entre los cinetocoros hermanos en telofase-I (Fig. 38 K, L). Sin embargo, en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>, encontramos que en metafase-I la señal de SYCP3 a lo largo del dominio intercromatídico es normal, pero no existe señal en forma de “T” en el centrómero, sino que aparece una pequeña señal en forma de punto justo debajo de los cinetocoros hermanos, los cuales están íntimamente asociados (Fig. 38 C, D) como en los individuos normales. Esto implica que SGOL2 no es necesaria para establecer la orientación sintética de los cinetocoros hermanos durante la prometafase-I. Sorprendentemente, en anafase-I temprana SYCP3 se redistribuye como pequeñas barritas que conectan los cinetocoros hermanos (detalles en Fig. 38 G e I) en una situación similar a lo que se encuentra en los espermatocitos normales en telofase-I. Además, los cinetocoros hermanos están mucho más separados que en la anafase-I temprana normal (comparar Fig. 38 E, F y G-J). Por otro lado, aparecen multitud de filamentos y algunos aglomerados de SYCP3 en la zona media del huso acromático (Fig. 38 G-J). Durante la anafase-I tardía y la telofase-I de individuos mutantes, SYCP3 persiste en algunas regiones centroméricas como pequeñas barritas, pero el número de filamentos citoplasmáticos decrece drásticamente (Fig. 38 M, N). Es interesante resaltar que en estas etapas la distancia intercinetocórica es mayor que en la anafase-I temprana. Todos estos datos implican que la ausencia de SGOL2 provoca una alteración en el dominio centromérico interno que lleva a una pérdida prematura de la cohesión intercinetocórica en la transición metafase-I/anafase-I, en lugar de hacerlo en anafase-I tardía y telofase-I como ocurre en los individuos WT.



Para analizar cuantitativamente el fenómeno de separación entre los cinetocoros hermanos en telofase-I, realizamos medidas de las distancias intercinetocóricas en los mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> y las comparamos con las medidas para un individuo normal (Tabla y Gráfico 9).

	Media y desviación	Valor máximo	Valor mínimo	n
<b>Telofase-I WT</b>	0.18 ± 0.03	0.28	0.13	50
<b>Telofase-I KO</b>	0.37 ± 0.05	0.47	0.20	50



**Tabla y Gráfico 9.** Distancias intercinetocóricas en telofase-I en individuos WT y *Sgol2*<sup>-/-</sup>.

Como se aprecia en la Tabla y Gráfico 9, la distancia entre los cinetocoros hermanos en telofase-I es el doble en los individuos mutantes para *Sgol2*<sup>-/-</sup> (KO) de la encontrada en los individuos normales (WT). Quisimos comprobar si existe diferencia estadísticamente significativa entre ambas medias. Es decir, contrastamos la distancia media entre los cinetocoros hermanos en telofase-I de los individuos mutantes para *Sgol2*<sup>-/-</sup> ( $\mu_{KO}$ ) es mayor que en los individuos normales ( $\mu_{WT}$ ). Dadas dos muestras de 50 elementos cada una, se obtuvieron sus estimadores de la media y la desviación típica, tal y como se ha reflejado anteriormente en la Tabla 9 y establecimos el siguiente test:

$$\begin{cases} H_0 : \mu_{KO} \geq \mu_{WT} \\ H_1 : \mu_{KO} < \mu_{WT} \end{cases}$$

Como el tamaño de las muestras son lo suficientemente grandes y por el Teorema Central del Límite, el estadístico que aplicamos para el contraste fue el siguiente:

$$t = \frac{(\bar{x} - \bar{y})\sqrt{n_1 + n_2 - 2}}{\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \sqrt{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}}, \text{ que sigue una distribución } t_{n_1 + n_2 - 2}.$$

Sustituyendo y realizando todas las operaciones aritméticas correspondientes, obtenemos que  $t = 22,585$ . Como la distribución del estadístico es conocida, procedemos a calcular el p-valor como sigue:  $p\text{-valor} = p(t_{98} \leq 22,585) \geq 0,9999 \approx 1$

Por lo tanto podemos decir que para cualquier nivel de significación  $\alpha$  (nivel de confianza  $1-\alpha$ ), no hay evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula. Estadísticamente, estamos en disposición de afirmar que la distancia entre los cinetocoros hermanos en telofase-I en los individuos mutantes para *Sgol2*<sup>-/-</sup> es mayor que en los individuos normales.

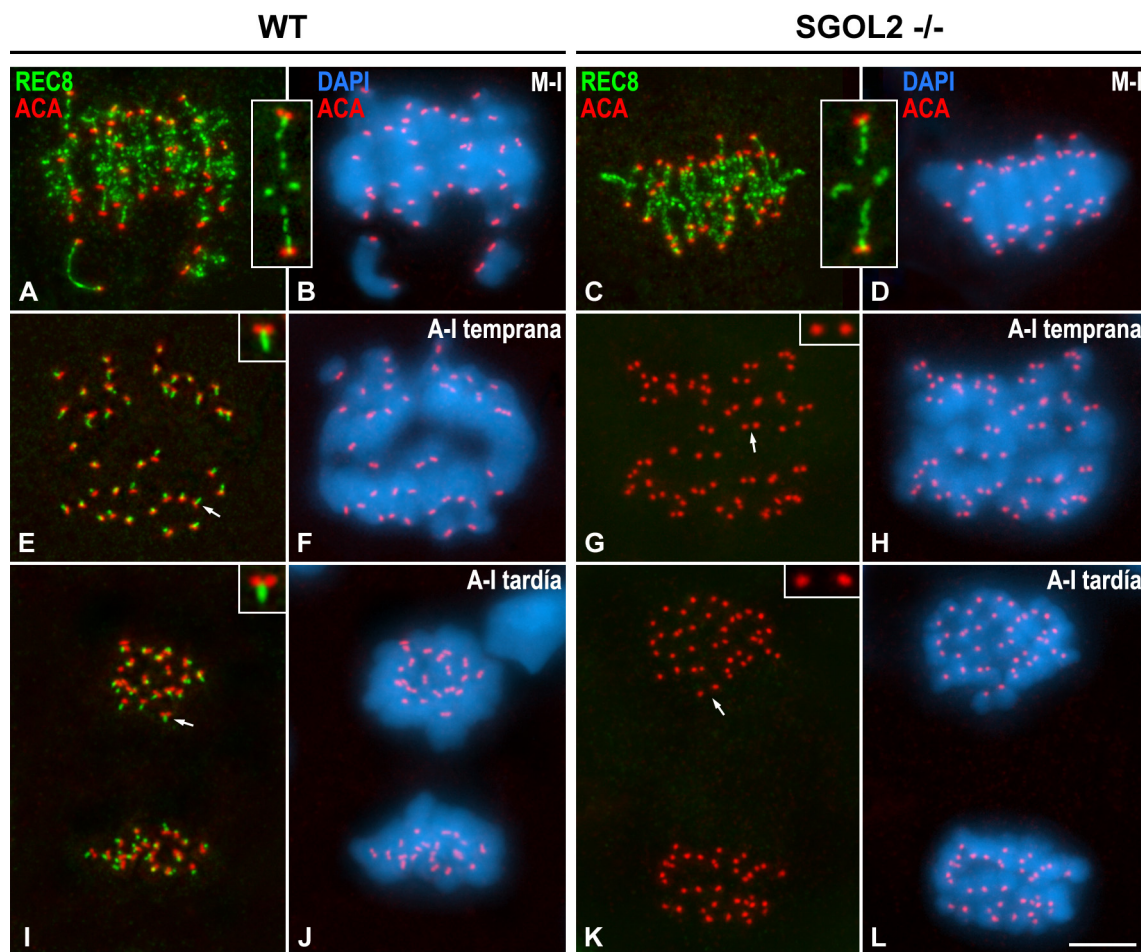
### 5.3. Dinámica de las cohesinas en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Para el estudio de las cohesinas en el mutante para la proteína SGOL2 escogimos en primer lugar a REC8 (Fig. 39), ya que es ella la protegida en la región centromérica por la Sgo1 frente a su degradación por Separasa durante la meiosis-I de *S. pombe* (Watanabe y Nurse, 1999; Lee y col., 2003; Kudo y col., 2006). Por ello, consideramos que era muy interesante observar cómo se comporta REC8 en ausencia de SGOL2. Además, también realizamos la detección de SMC3 (Fig. 40), así como de RAD21 (imágenes no mostradas), que como ya hemos comentado con anterioridad, tiene exactamente el mismo patrón de localización que SYCP3 (Parra y col., 2004).

#### 5.3.1. Distribución de REC8 en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Tras realizar la doble inmunolocalización de REC8 junto a los cinetocoros en individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> pudimos observar que el marcaje de REC8 en profase-I sobre los EAs/ELs del CS es totalmente normal (imágenes no mostradas). La señal que encontramos en bivalentes en metafase-I es también normal en el mutante, así, podemos ver que REC8 se localiza en el dominio intercromatídico y en el dominio centromérico con una pequeña señal bajo los cinetocoros hermanos tanto en los individuos WT (Fig. 39 A, B) como en los KO (Fig. 39 C, D). Sin embargo, tal y como ocurre para SYCP3, se produce un cambio muy significativo en la anafase-I, ya que si bien en individuos WT REC8 aparece como una pequeña señal en forma de coma bajo los cinetocoros

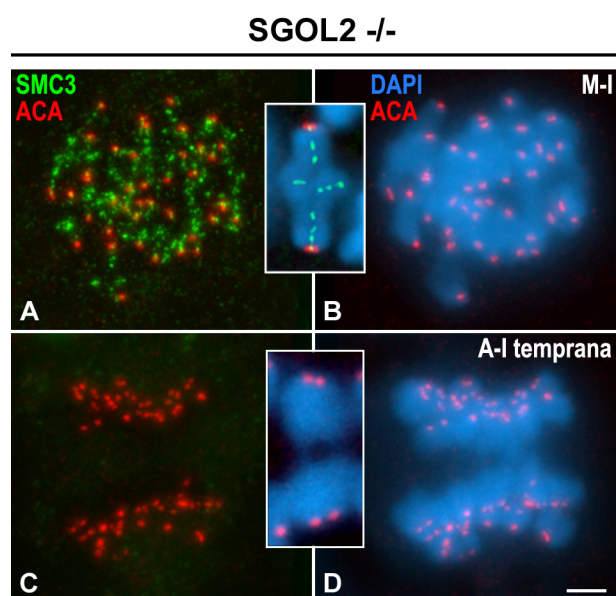
hermanos (Fig. 39 E, F), en el mutante ya no se observa ningún marcaje de REC8 en esta etapa, y además los cinetocoros hermanos aparecen mucho más separados de lo normal (Fig. 39 G, H). En telofase-I, se sigue sin detectar señales de REC8 en el KO (Fig. 39 K, L), mientras que en los individuos WT todavía pueden observarse “comas” de REC8 (Fig. 39 I, J). Estos datos indican que en ausencia de SGOL2, REC8 sólo persiste hasta la metafase-I en los centrómeros.



**Figura 39.** Doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en metafase-I y anafase-I de un individuo WT y en el mutante *Sgo12<sup>-/-</sup>*. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) Metafase-I de WT. REC8 aparece como parches a lo largo del dominio intercromatídico. El detalle muestra a mayor aumento la señal de REC8 que llega hasta justo debajo de las señales de los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. (C, D) Metafase-I del mutante *Sgo12<sup>-/-</sup>*. La señal de REC8 es igual a la encontrada en el individuo WT. (E, F) Anafase-I temprana de WT. La flecha en E indica la señal de REC8 con forma de coma bajo los cinetocoros hermanos íntimamente asociados de uno de los cromosomas homólogos, la cual se muestra ampliada en el detalle. (G, H) Anafase-I temprana del mutante *Sgo12<sup>-/-</sup>*. La flecha en G indica la ausencia de marcaje de REC8 entre los cinetocoros hermanos claramente individualizados de uno de los cromosomas, que se muestra a mayor aumento en el detalle. (I, J) Anafase-I tardía de WT. La flecha en I indica la señal de REC8 con forma de coma bajo los cinetocoros hermanos asociados, la cual se muestra ampliada en el detalle. (K, L) Anafase-I tardía del mutante *Sgo12<sup>-/-</sup>*. La flecha en K indica la ausencia de marcaje de REC8 entre los cinetocoros hermanos claramente individualizados, que se muestra a mayor aumento en el detalle. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 5  $\mu$ m.

### 5.3.2. Distribución de SMC3 en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Tras realizar la doble inmunolocalización de SMC3 junto a los cinetocoros en individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> pudimos observar un comportamiento similar al que muestra REC8. En la metafase-I de individuos mutantes, observamos una señal normal de SMC3 en el dominio intercromatídico y en el dominio centromérico bajo los cinetocoro hermanos (Fig. 40 A, B). Sin embargo, volvemos a encontrar ausencia de SMC3 de los centrómeros en anafase-I temprana apareciendo los cinetocoros hermanos individualizados y mucho más separados de lo normal (Fig. 40 C, D).



**Figura 40.** Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en metafase-I y anafase-I del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) Metafase-I. El detalle muestra a mayor aumento la señal de SMC3 a modo de parches en el dominio intercromatídico en un bivalente autosómico seleccionado. La señal de SMC3 llega hasta justo debajo de las señales de los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. (C, D) Anafase-I temprana. El detalle muestra a mayor aumento la ausencia de marcaje de SMC3 en una pareja de cromosomas homólogos que están comenzando a segregar, en el cual se pueden apreciar las señales de los cinetocoros hermanos individualizados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 3 μm.

### 5.4. Estudio de proteínas implicadas en la entrada en anafase en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Debido a que nuestros resultados sugieren que la ausencia de SGOL2 provoca la pérdida de cohesión centromérica en “*metaphase-II-like*”, quisimos saber si este fenómeno afecta al SAC, es decir, si al estar todas las cromátidas ya separadas en “*metaphase II-like*” se retrasa o se impide la entrada en anafase-II. Para ello, hemos realizado la inmunodetección de dos proteínas implicadas en este proceso: CENP-E y BubR1. Es importante clarificar que estas dos proteínas no tienen un patrón de presencia/ausencia cuando los cinetocoros están enganchados a MTs y sujetos a tensión, sino que se trata de un cambio de intensidad y tamaño de la señal.

#### 5.4.1. Distribución de CENP-E en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

CENP-E es una proteína motora responsable de los movimientos cromosómicos, que se localiza en la corona fibrosa y lámina externa del cinetocoro (Cooke y col., 1997). En los individuos WT y durante la congresión cromosómica en la prometafase-I, los cinetocoros no unidos a los MTs del huso muestran una señal grande e intensa de CENP-E en forma de “C”, mientras que los ya unidos presentan una pequeña señal en forma de placa. Además, CENP-E permanece unida al cinetocoro en forma de placa hasta la anafase-I, cuando empieza a separarse de él, y se redistribuye hacia los MTs interzonales (Parra y col., 2002).

En los individuos mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> encontramos que, al igual que ocurre en WT, la mayoría de los bivalentes tienen una señal intensa de CENP-E en forma de “C” sobre los cinetocoros en prometafase-I temprana (Fig. 41 A, B). A medida que la prometafase-I avanza y los bivalentes van biorientando en placa, observamos que en todos aquellos bivalentes que ya han orientado la señal de CENP-E sobre los cinetocoros ha reducido mucho su brillo y tamaño, en cambio la señal en forma de “C” persiste en los cinetocoros de aquellos bivalentes que todavía no están en placa (Fig. 41 C, D). Cuando ya todos los bivalentes están en placa en metafase-I, todas las señales de CENP-E son muy pequeñas y poco intensas (Fig. 41 E, F). En anafase-I temprana, donde volvemos a encontrar los cinetocoros hermanos individualizados y muy separados por la prematura pérdida de la cohesión centromérica, CENP-E comienza a aparecer en los MTs interzonales (Fig. 41 G, H). Este mismo marcaje persiste en anafase-I tardía, en la cual los cinetocoros hermanos están aún más separados (Fig. 41 I, J). El marcaje de CENP-E durante la telofase-I queda restringido a la zona ecuatorial de los MTs interzonales (Fig. 41 K, L) y finalmente en el cuerpo medio del huso (Fig. 41 M).

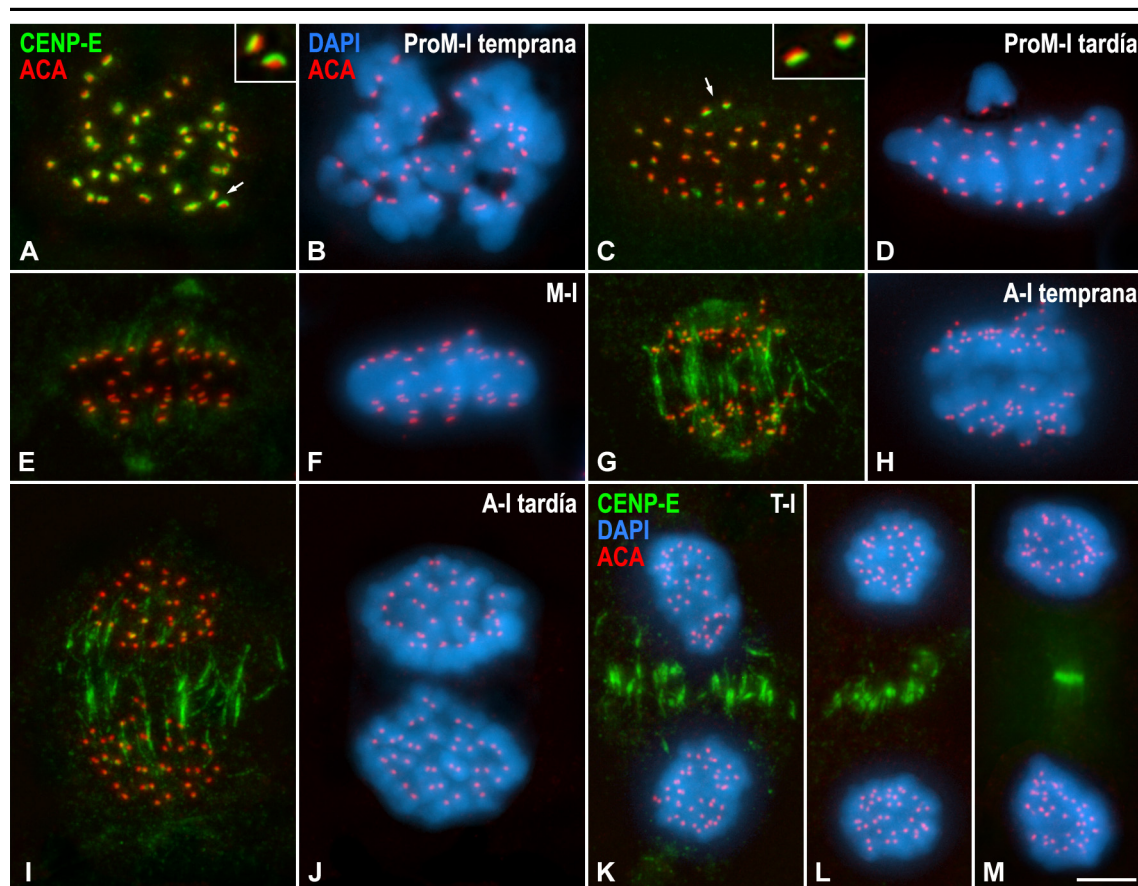
En la segunda división meiótica de los individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> el patrón de distribución de CENP-E es muy interesante. En profase-II, CENP-E se acumula intensamente en forma de “C” sobre los cinetocoros, puesto que los cromosomas todavía no están enganchados a MTs al persistir la EN (Fig. 42 A, B). En “*metaphase-II like*” observamos que todas las cromátidas, que ya están individualizadas, tienen un intenso marcaje de CENP-E sobre sus cinetocoros (Fig. 42 C-F). En algunas pocas células que se podrían clasificar como “*anaphase-II like*” aparece un cierto marcaje de CENP-E en los MTs interzonales (Fig. 42 G, H). En ocasiones hay células que hemos clasificado



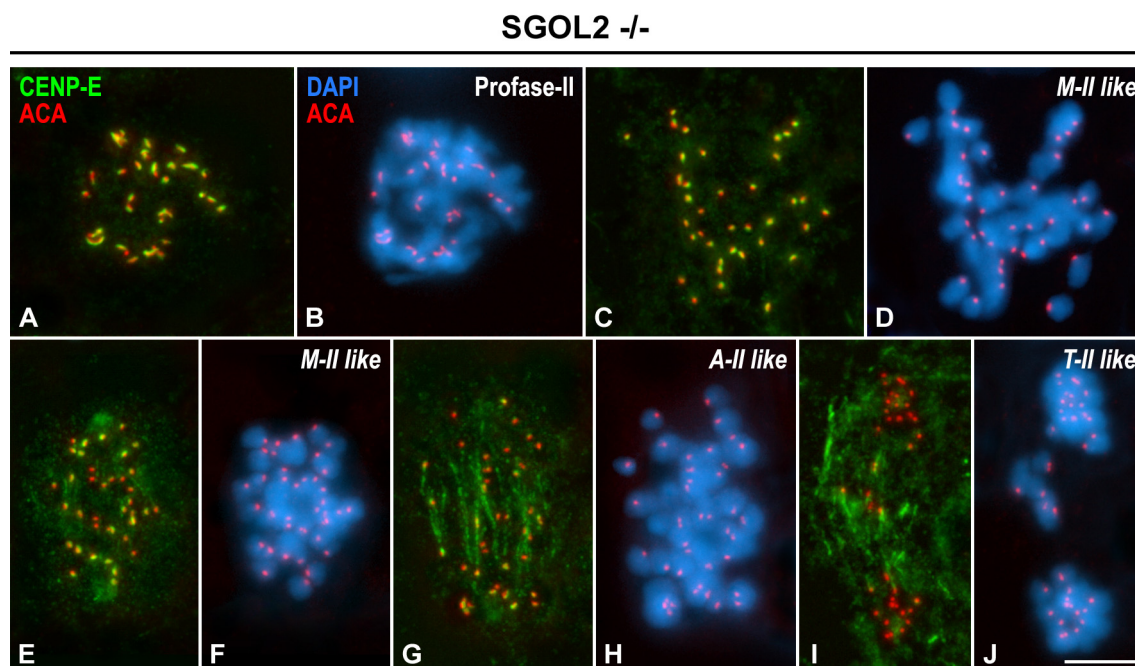
como “*telophase-II like*” que muestran dos polos y cromátidas retrasadas en las que se observa un cierto marcaje de CENP-E en sus cinetocoros (Fig. 42 I, J).

Los resultados obtenidos con CENP-E apuntan que el SAC sigue activo en “*metaphase-II like*” debido a la ausencia de cohesión centromérica en los cromosomas que lleva a una incapacidad de biorientar de las cromátidas sueltas.

#### SGOL2 -/-



**Figura 41.** Doble inmunolocalización de CENP-E (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas de la primera división meiótica del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. (A, B) Prometáfase-I temprana. CENP-E marca intensamente todos los cinetocoros. La flecha en A indica las señales de CENP-E y de los cinetocoros en dos centrómeros, las cuales se muestran aumentadas en el detalle. (C, D) Prometáfase-I tardía. CENP-E sólo marca intensamente los cinetocoros de un bivalente que no se ha alineado en la placa ecuatorial. La flecha en C indica las señales de CENP-E y de los cinetocoros en un bivalente fuera de placa, las cuales se muestran ampliadas en el detalle. (E, F) Metafase-I. No se observa prácticamente marcaje de CENP-E en los cinetocoros cuando todos los bivalentes están alineados en placa. (G-M) Anafase-I y telofase-I. CENP-E marca haces de MTs interzonales en la zona media del huso (G-L) y en el cuerpo medio (M). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en M representa 5  $\mu$ m.



**Figura 42.** Doble inmunolocalización de CENP-E (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas de la segunda división meiótica del mutante *Sgol2<sup>-/-</sup>*. La cromatina se ha contraído con DAPI (azul). (A-F) Profase-II y “*metaphase-II like*”. CENP-E aparece como una intensa señal sobre todos los cinetocoros. (G-J) “*Anaphase-II like*” y “*telophase-II like*”. CENP-E marca haces de microtúbulos interzonales entre los grupos de cromátidas que están segregando a polos opuestos de la célula. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en J representa 5  $\mu$ m.

#### 5.4.2. Distribución de BubR1 en el mutante *Sgol2<sup>-/-</sup>*

BubR1 es una quinasa que también interviene en la regulación del punto del *checkpoint* mitótico (Chan y col., 1999; Yao y col., 2000). Según está descrito BubR1 y CENP-E podrían formar un complejo mecanosensor de la tensión (Chan y col., 1998). Los datos que obtuvimos con BubR1 en individuos WT durante la primera división meiótica son muy similares a los que veíamos con CENP-E con la salvedad de que BubR1 no marca los MTs interzonales en anafase-I (datos no mostrados). En individuos WT, BubR1 marca una intensa señal sobre todos los cinetocoros en profase-II (Fig. 43 A, B), ya que los cromosomas no están tensionados. En prometafase-II la señal de BubR1 decrece significativamente en aquellos cromosomas que orientan sus cinetocoros hermanos a polos opuestos, pero persiste grande y brillante en los que todavía no están en placa (Fig. 43 C-F). Y es ya en metafase-II cuando la señal de BubR1 es casi inapreciable ya que todos los cromosomas están orientados en placa (Fig. 43 E, F). En ausencia de SGOL2, observamos que el patrón de distribución de BubR1 en prometafase-I temprana (Fig. 43 G, H), prometafase-I tardía (Fig. 43 I-L) y metafase-

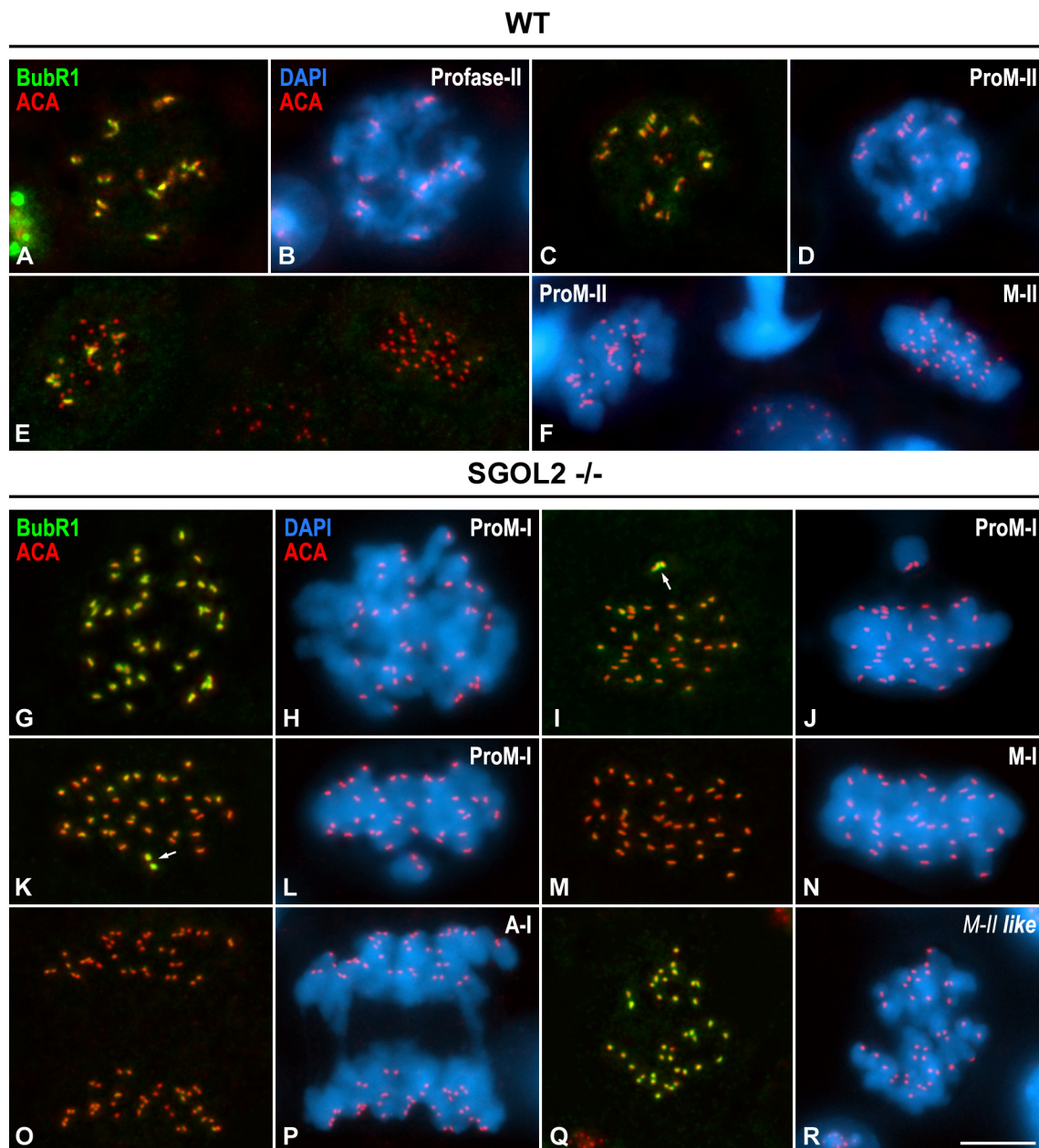
I (Fig. 43 M, N) es normal, es decir, se marcan únicamente los cinetocoros de los bivalentes que no están en placa. En anafase-I, vemos todos los cinetocoros hermanos muy separados y prácticamente no hay señal de BubR1 sobre ellos (Fig. 43 O, P). Pero en “*metaphase-II like*”, observamos un patrón de distribución de BubR1 comparable a lo observado con CENP-E, todos los cromátidas separadas tienen una intensa señal de BubR1 sobre sus cinetocoros como resultado de su imposibilidad de biorientar en placa (Fig. 43 Q, R).

Los resultados obtenidos con BubR1 también apuntan por tanto que el SAC sigue activo en “*metaphase-II like*” debido a la ausencia de cohesión centromérica en los cromosomas que lleva a una incapacidad de biorientar las cromátidas sueltas.

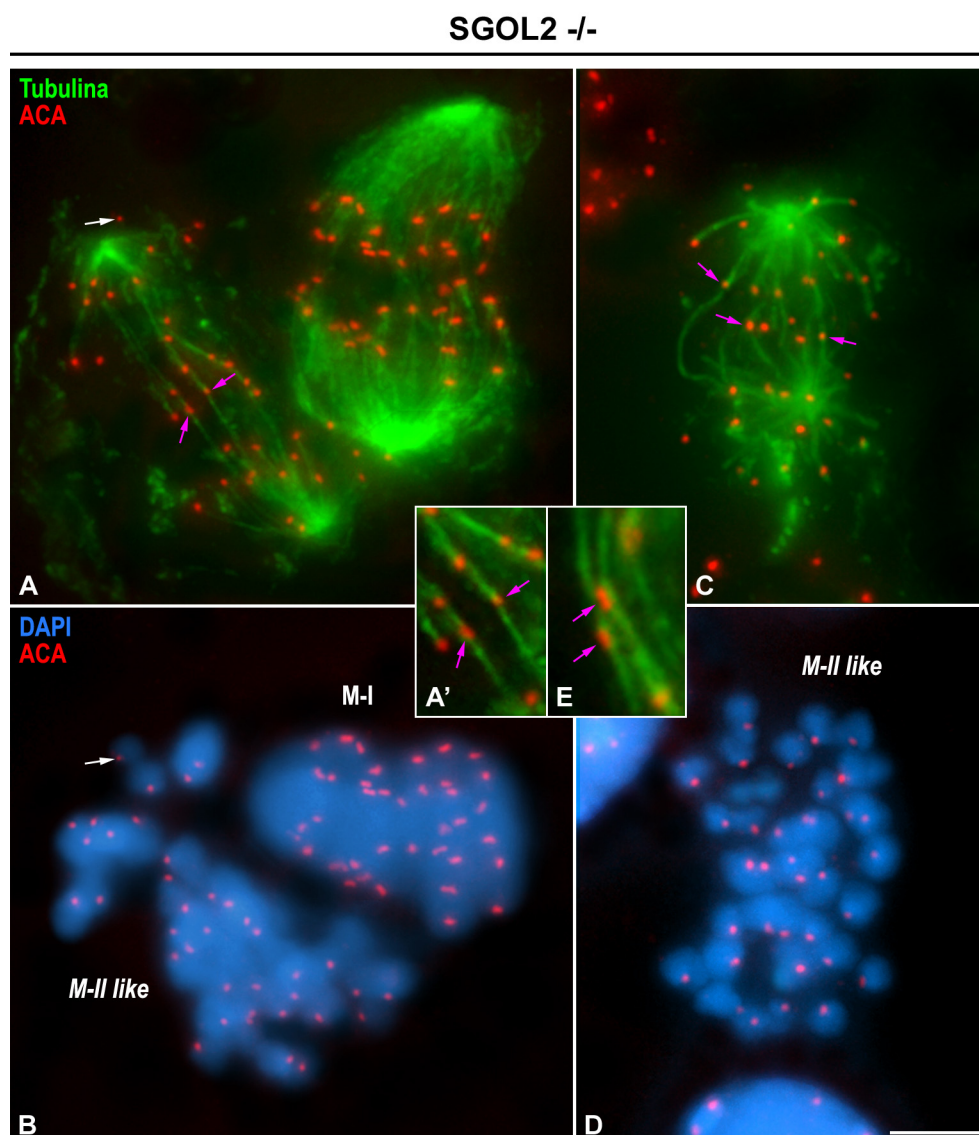
### 5.5. Dinámica de $\alpha$ -Tubulina en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>

Para poder comprobar si el bloqueo del SAC que vemos con CENP-E y BubR1 en las “*prometaphase-II like*” de individuos mutantes se debe a la existencia de cinetocoros con uniones merotéticas a MTs (unión de un mismo cinetocoro a haces de MTs provenientes de polos opuestos), realizamos la doble inmunodetección de  $\alpha$ -Tubulina y los cinetocoros. Podemos comprobar que las metafases-I tienen un comportamiento normal, ya que ambos cinetocoros hermanos de un mismo cromosoma orientan sintéticamente a un mismo polo (Fig. 44 A, B). Sin embargo, en las “*metaphase-II like*”, cuando podemos observar todas las cromátidas del complemento sueltas, pueden apreciarse cinetocoros a los que llegan haces de MTs provenientes de ambos polos del huso (flechas rosas en Fig. 44). Además, se observan en ocasiones cromátidas cercanas a los polos que no presentan asociación con MTs (flechas blancas en Fig. 44 A, B). En estas “*metaphase-II like*” se aprecia como hay un grupo de cromátidas que está orientando a un polo, otro grupo orientado al polo opuesto, y un último grupo que queda retrasado en el centro de la célula. Algunas células que queden bloqueadas en esta etapa por su imposibilidad de entrar en anafase entrarán en apoptosis con una morfología semejante a la encontrada en la Figura 36 C-E.





**Figura 43.** Doble inmunolocalización de BubR1 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas meióticas en un individuo WT y en el mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-F) En el individuo WT BubR1 marca intensamente los cinetocoros en profase-II y prometafase-II, mientras que en metafase-II prácticamente desaparece el marcaje. (G, H) Prometafase-I temprana del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. BubR1 marca todos los cinetocoros. (I-L) Prometafases-I tardías del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. BubR1 aparece como una intensa señal sobre los cinetocoros de los bivalentes que se encuentran fuera de placa (flechas en I y K). (M, N) Metafase-I del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. No se detectan señales brillantes de BubR1 en los cinetocoros de los bivalentes alineados. (O, P) Anafase-I del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. Tampoco se detectan señales brillantes de BubR1. (Q, R) “Metaphase-II like” del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. Se observa una intensa señal de BubR1 en todos los cinetocoros de las cromátidas sueltas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en R representa 5 µm.



**Figura 44.** Doble inmunolocalización de Tubulina (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en metafase-I y “*metaphase-II like*” del mutante *Sgo2*<sup>-/-</sup>. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Se observan los haces de MTs cinetocóricos en la metafase-I. Las flechas blancas en A y B indican un cinetocoro de una cromátida suelta de la “*metaphase-II like*” que no está anclada a ningún MT. Las flechas rosas en A y C indican uniones merotéticas de los cinetocoros a los MTs, las cuales se muestran a mayor aumento en el detalle A’. En el detalle E se muestran a mayor aumento algunas uniones merotéticas de los cinetocoros de otra “*metaphase-II like*”. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 5  $\mu$ m.

## **6. Análisis de la distribución de Topo II**

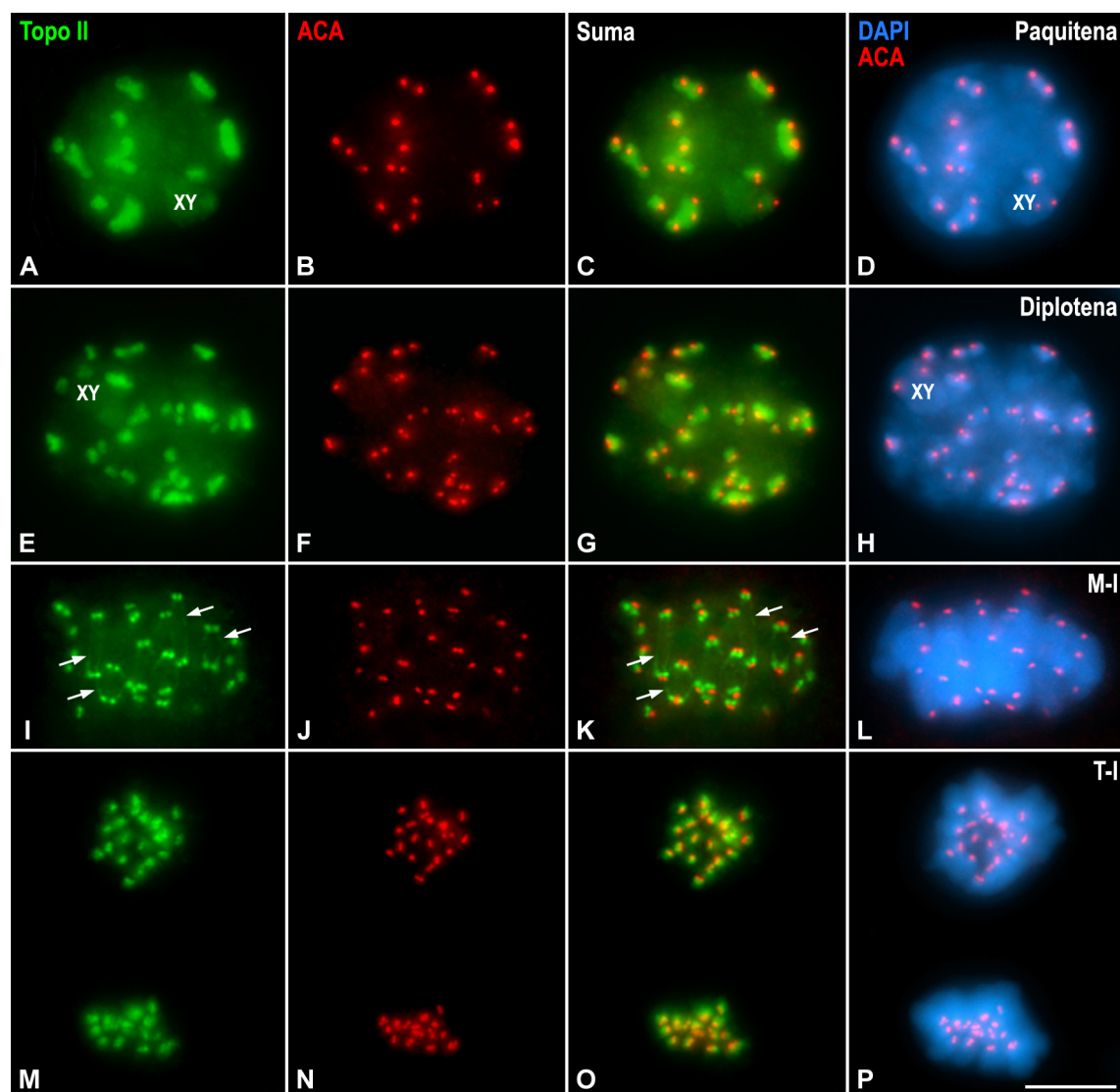
### **6.1. Primera división meiótica**

Para poder analizar la distribución de la DNA Topoisomerasa II $\alpha$  (Topo II) realizamos dobles inmunolocalizaciones de la misma junto con los cinetocoros, con objeto de identificar de forma inequívoca su distribución en las diferentes etapas de la meiosis. Topo II se localiza en los cromocentros desde leptotena (imagen no mostrada). En paquitenia Topo II se localiza en los cromocentros, que son grupos de regiones centroméricas hipercromáticas con DAPI dentro de las cuales se encuentran las señales cinetocóricas (Fig. 45 A-D). Además, Topo II da un cierto marcaje homogéneo positivo en todo el nucleoplasma. En diplotena seguimos observando los cromocentros marcados con Topo II, si bien las señales no son tan definidas, sino más dispersas y disgregadas (Fig. 45 E-H). Esto corresponde con el momento de inicio de la desinapsis en la cual los centrómeros homólogos se separan lo que permite observar más señales correspondientes a cromocentros. La señal de Topo II en metafase-I se hace mucho más nítida (Fig. 45 I-L). De este modo, observamos que Topo II se localiza intensamente en los centrómeros en forma de dos bolas localizadas justo por debajo de los cinetocoros hermanos y colocalizando muy parcialmente con ellos. Estas señales redondeadas están muy juntas llegando en algunas ocasiones a parecer una única señal ovalada. Asimismo, Topo II marca débilmente los ejes cromatídicos de los bivalentes (flechas en Fig. 45 I, K). Durante la telofase-I vemos que Topo II persiste como dos señales intensas redondeadas por debajo de los cinetocoros hermanos, los cuales se encuentran ligeramente más separados que en metafase-I coincidiendo con la pérdida de cohesión intercinetocórica (Fig. 45 M-P).

### **6.2. Segunda división meiótica**

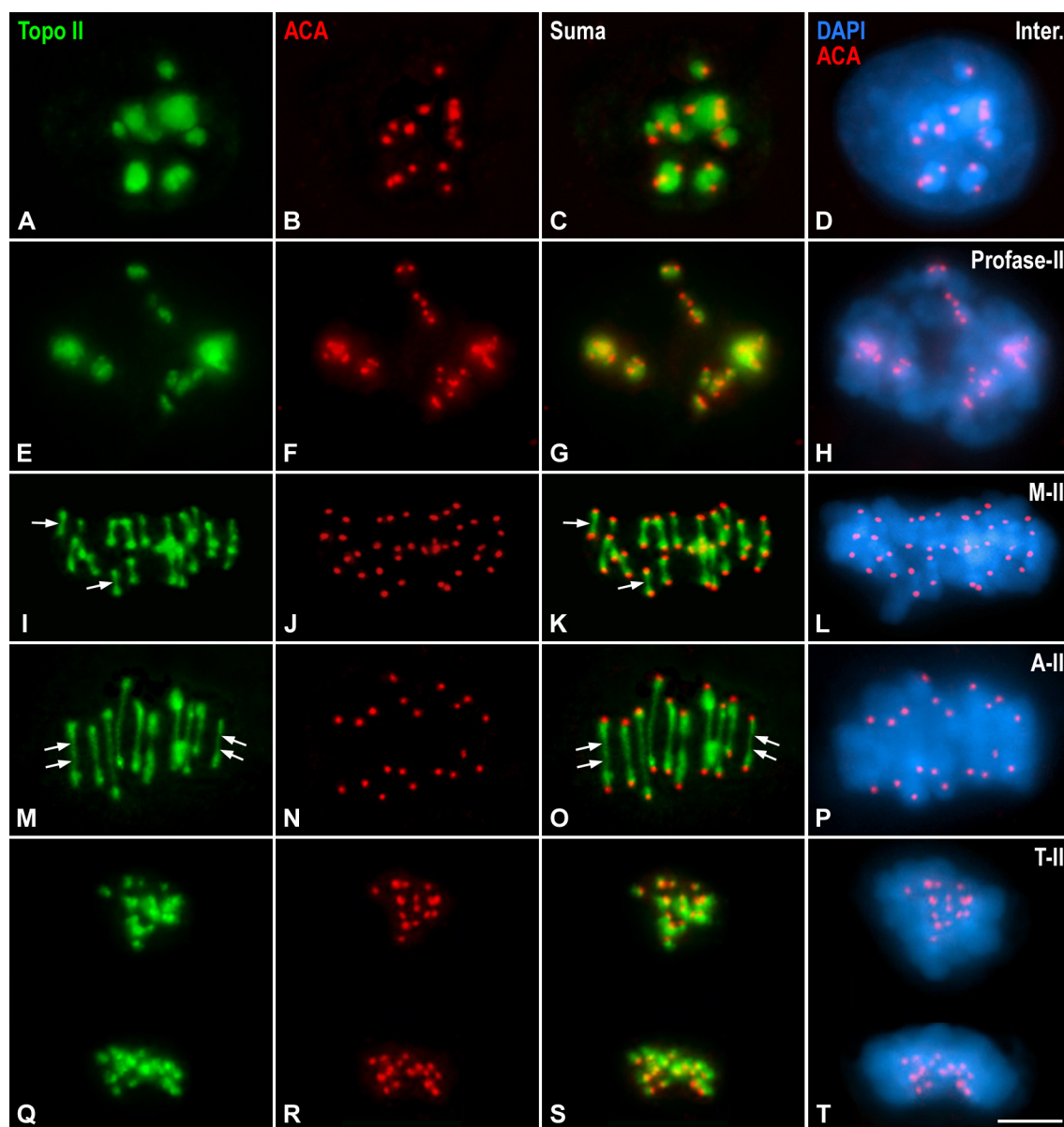
En intercinesis, Topo II vuelve a encontrarse marcando los cromocentros, que pueden distinguirse muy claramente con DAPI y dentro de los cuales encontramos grupos de cinetocoros (Fig. 46 A-D). Topo II también se localiza intensamente en los centrómeros durante la profase-II (Fig. 46 E-H). Es ya en metafase-II cuando encontramos que Topo II se localiza a modo de una banda que conecta transversalmente los cinetocoros hermanos (Fig. 46 I-L). Estas intensas bandas generalmente son más delgadas en el dominio centromérico interno y más gruesas en la región que se

encuentra justo debajo de cada cinetocoros (cabezas de flecha en Fig. 46 I, K) (Vídeo 9 en material suplementario). En anafase-II temprana (Fig. 46 M-P), estas señales transversales de Topo II que conectan los cinetocoros hermanos se van alargando a medida que las cromátidas hermanas comienzan a segregarse a polos opuestos, y se van convirtiendo en hebras cada vez más finas hasta que desaparecen, permaneciendo únicamente una señal redondeada bajo cada cinetocoro en telofase-II (Fig. 46 Q-T) (Vídeo 10 en material suplementario).



**Figura 45.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados durante la primera división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-H) Paquitena y diplotena. Topo II marca los cromocentros. (I-L) Metafase-I. Topo II marca los ejes cromatídicos (flechas en I y K) y se detecta en los centrómeros como dos intensas señales redondeadas bajo los cinetocoros hermanos. (M-P) Telofase-I. Topo II marca intensas señales redondeadas bajo los cinetocoros hermanos. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.

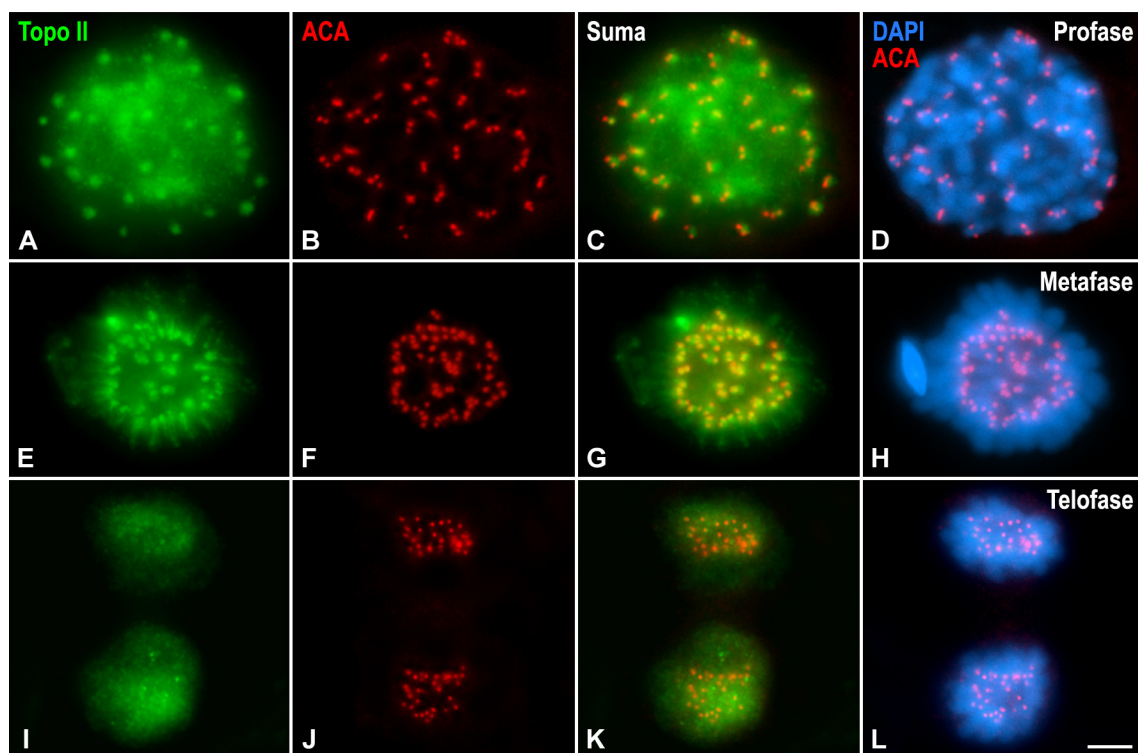




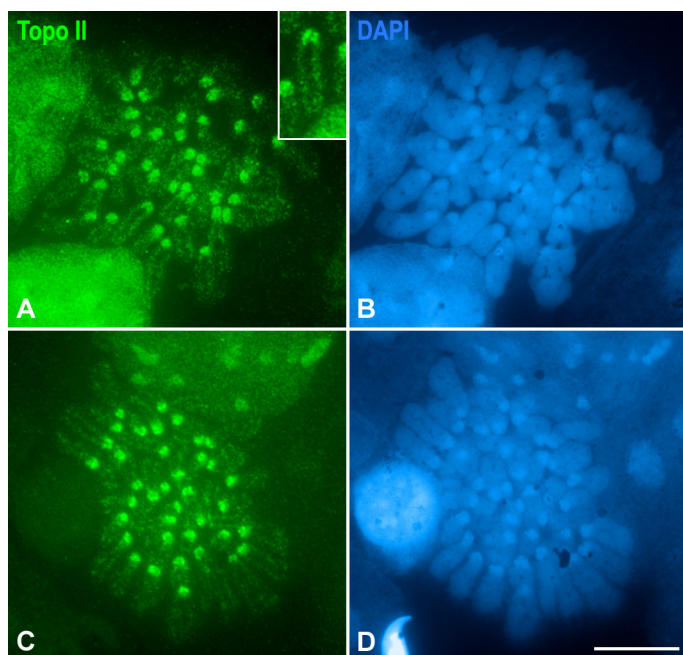
**Figura 46.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados durante la segunda división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-H) Topo II marca unas intensas señales sobre los cromocentros en intercinesis (A-D) y en profase-II. (I-L) Metafase-II. Topo II marca unas intensas barras (flechas) entre los cinetocoros hermanos de todos los cromosomas. (M-P) Anafase-II temprana. Topo II marca intensas hebras (flechas) que conectan los cinetocoros hermanos. (Q-T) Telofase-II. Topo II marca señales redondeadas en los centrómeros. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en T representa 3  $\mu$ m.

### 6.3. Mitosis espermatogonial

En las preparaciones de aplastados de túbulos seminíferos también se encuentran espermatogonias en diferentes etapas de mitosis. En estas células pudimos observar que Topo II se localiza en los centrómeros y con un marcaje homogéneo y tenue en el nucleoplasma durante la profase (Fig. 47 A-D). En la metafase vemos que Topo II marca intensamente dos señales redondeadas prácticamente unidas bajo los cinetocoros hermanos (Fig. 47 E-H). Estas señales centroméricas colocalizan parcialmente con las parejas de cinetocoros hermanos (Fig. 47 G). Además, al igual que ocurre en metafase-I, Topo II marca los ejes cromatídicos en los cromosomas condensados en metafase tanto en aplastado (Fig. 47 E) como en esparcido (Fig. 48). En anafase y telofase mitóticas, únicamente persiste una leve señal de Topo II en los centrómeros (Fig. 47 I-L).



**Figura 47.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatogonias aplastadas. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Profase. Topo II marca los centrómeros así como un leve marcaje homogéneo sobre el nucleoplasma. (E-H) Metafase. Topo II marca débilmente los ejes cromatídicos y una señal redondeada entre los cinetocoros hermanos. (I-L) Telofase. Topo II marca unas suaves señales sobre los centrómeros. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 3  $\mu$ m.



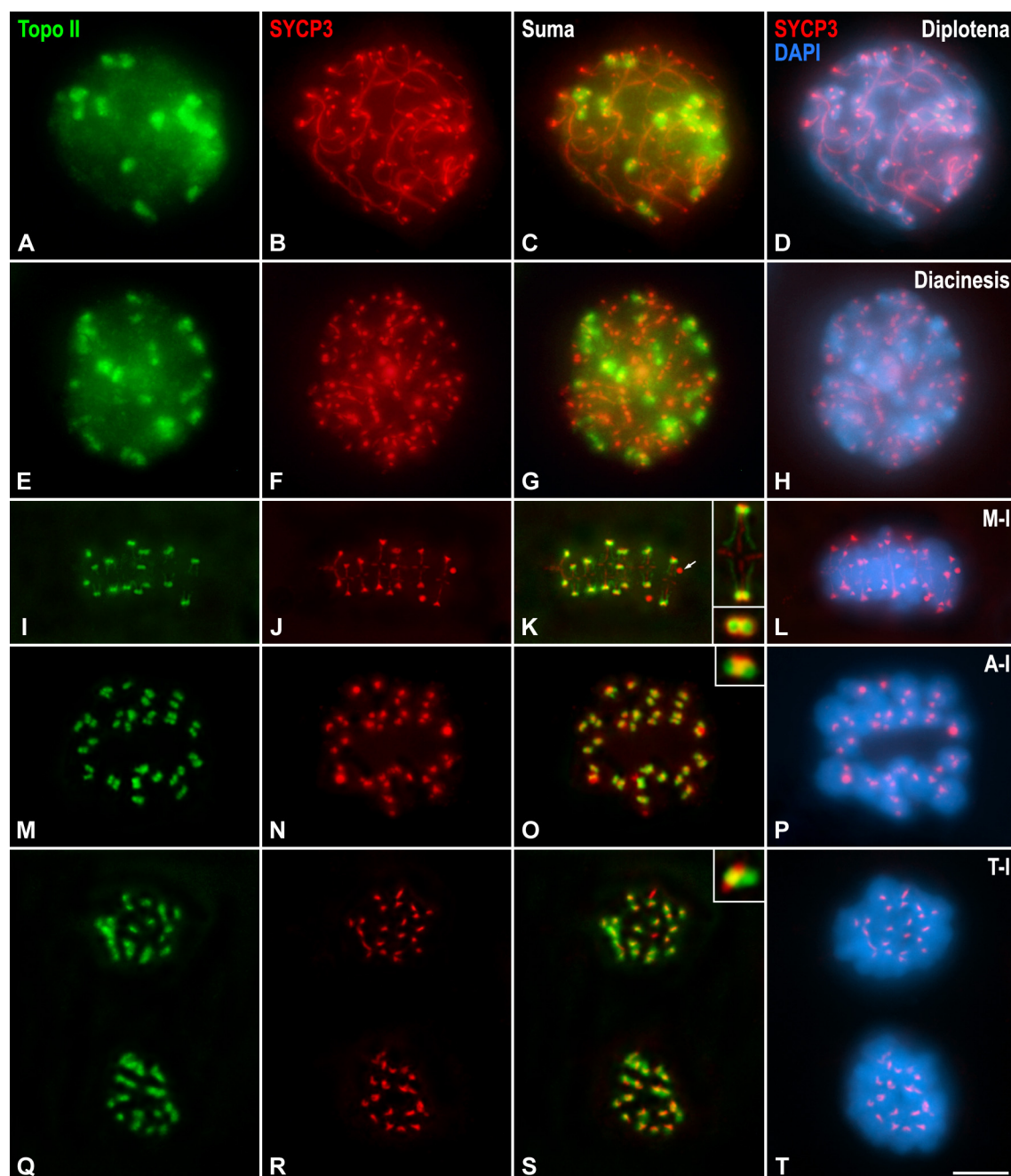
**Figura 48.** Inmunolocalización de Topo II (verde) y contratinción con DAPI (azul) en metafases espermatogoniales esparcidas. El detalle en A muestra a mayor aumento el marcaje de Topo II en los centrómeros y sobre los ejes cromatídicos en un cromosoma seleccionado de una metafase espermatogonial. La barra de medida en B representa 5  $\mu$ m.

#### 6.4. Distribución relativa de Topo II y SYCP3

Para observar las distribuciones relativas de Topo II y SYCP3 durante la meiosis realizamos dobles inmunodetecciones tanto en aplastado (Fig. 49 y 50) como en esparcido (Fig. 51 y 52).

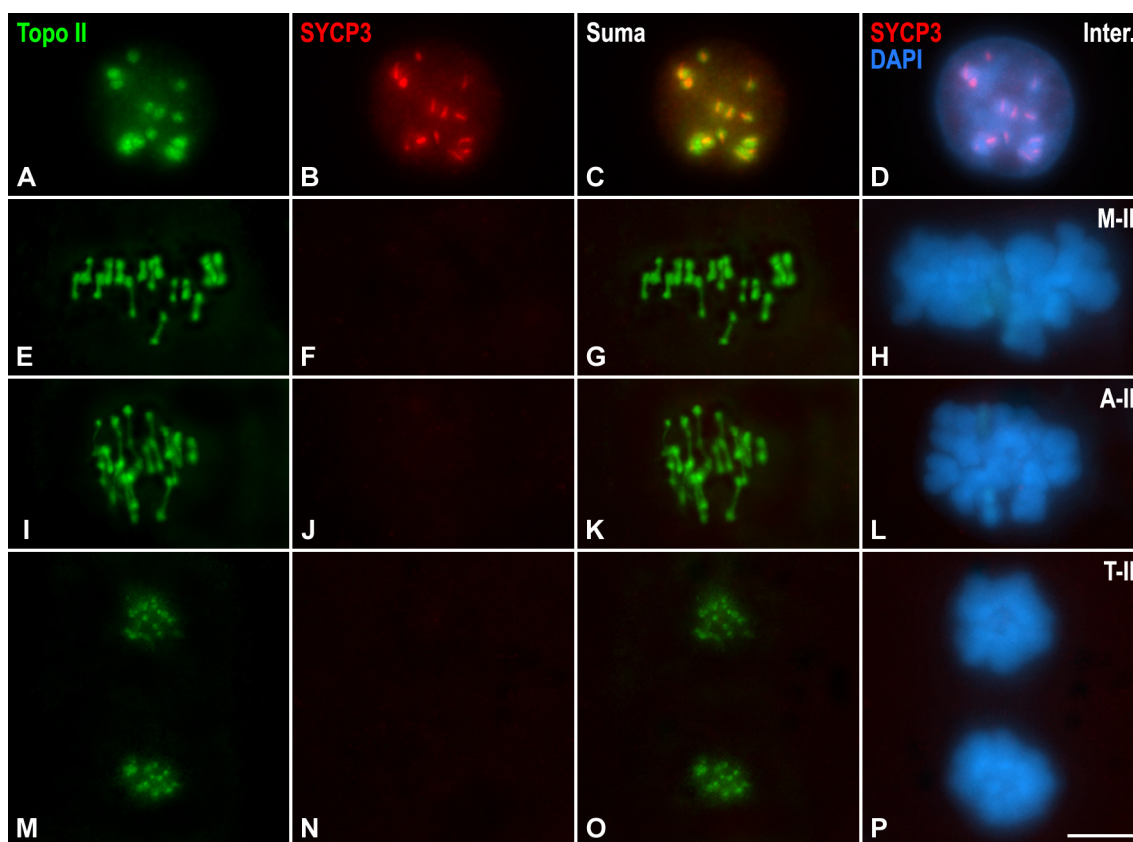
Al realizar la doble inmunodetección de Topo II y SYCP3 en preparaciones de espermatocitos aplastados observamos que Topo II se localiza sobre los centrómeros mientras que SYCP3 se localiza a lo largo de los EAs/ELs durante la profase-I (se muestra una diplotena en Fig. 49 A-D). Además, SYCP3 aparece también en engrosamientos sobre los ELs en diacinesis (Fig. 49 E-H). En metafase-I podemos ver cómo las señales de ambas proteínas colocalizan parcialmente en la región centromérica, distinguiéndose claramente las señales en forma de “T” de SYCP3 frente a las dos señales redondeadas de Topo II bajo los cinetocoros hermanos (Fig. 49 I-L). En un análisis más detallado es muy interesante observar que SYCP3 marca el dominio intercromatídico mientras que Topo II marca los ejes cromatídicos en visión frontal y que el doble anillo de SYCP3 abraza a las dos señales redondeadas de Topo II en visión polar (detalles en Fig. 49 K). En metafase-I también aparecen las características acumulaciones de SYCP3 en el citoplasma (flecha en Fig. 49 K). En anafase-I no se observa la señal intercromatídica de SYCP3 ni el marcaje de los ejes cromatídicos de Topo II, mientras que se conservan las señales en forma de “T” de SYCP3 y las señales

redondeadas de Topo II bajo los cinetocoros hermanos (Fig. 49 M-P). En telofase-I, permanecen las señales centroméricas de Topo II mientras que SYCP3 se redistribuye a señales en forma de barra (Fig. 49 Q-T). En intercinesis, las señales en forma de barra de SYCP3 se localizan sobre los cromocentros marcados con Topo II (Fig. 50 A-D). En metafase-II y anafase-II temprana observamos las señales transversales de Topo II entre los cinetocoros hermanos mientras que no vemos ninguna señal de SYCP3 (Fig. 50 E-L). En telofase-II observamos débiles señales centroméricas de Topo II mientras que tampoco detectamos señales de SYCP3 (Fig. 50 M-P).



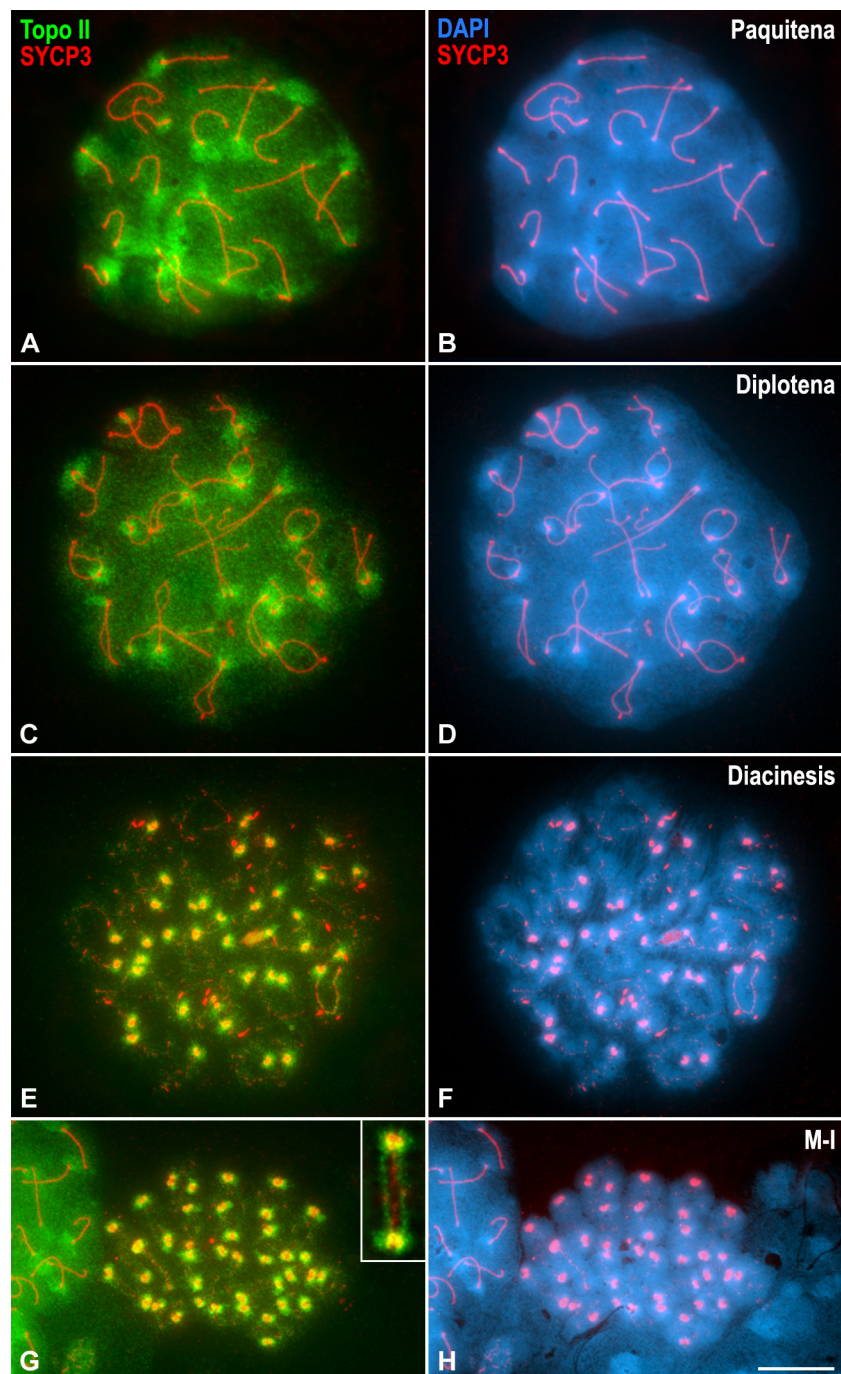


◀ **Figura 49.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y SYCP3 (rojo) en espermatoцитos aplastados durante la primera división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Diplotena. Topo II marca los cromocentros mientras que SYCP3 se detecta sobre los ELs sinapsados y desinapsados. (E-H) Diacinesis. Topo II marca los cromocentros y SYCP3 se detecta sobre los ELs desinapsados a lo largo de los cuales se observan intensos engrosamientos. (I-L) Metafase-I. Topo II marca los ejes cromatídicos y dos señales redondeadas en los centrómeros. SYCP3 marca una señal en forma de “T” en los centrómeros y una señal a modo de parches en el dominio intercromatídico. La flecha en K indica un aglomerado citoplasmático de SYCP3. Los detalles en K muestran a mayor aumento la visión lateral de un bivalente autosómico y la visión frontal de un centrómero donde se observan las distribuciones relativas de SYCP3 y Topo II. (M-P) Anafase-I. Topo II persiste como dos señales redondeadas en los centrómeros mientras que SYCP3 se detecta como señales en forma de “T” (detalle en O). (Q-T) Telofase-I. Persisten las señales redondeadas de Topo II en los centrómeros mientras que SYCP3 cambia su conformación a forma de barras (detalle en S). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en T representa 5  $\mu$ m.

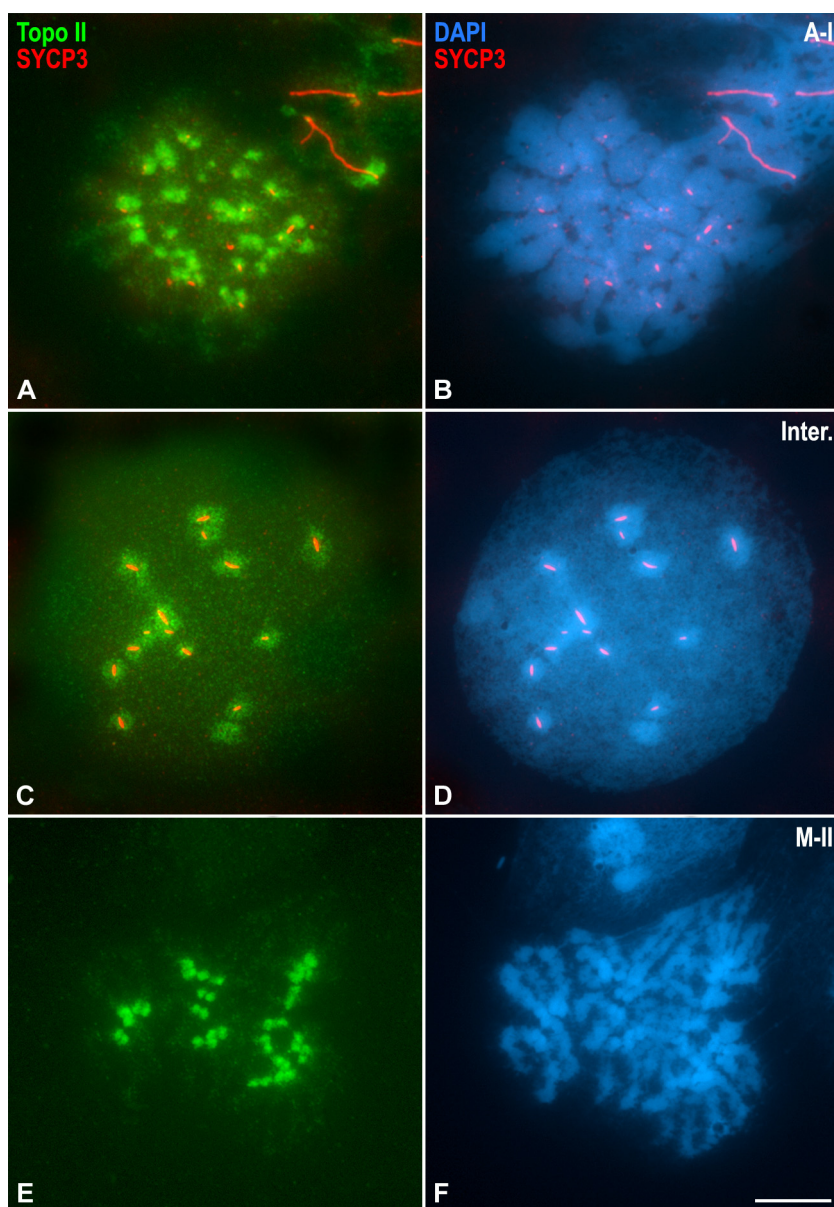


**Figura 50.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y SYCP3 (rojo) en espermatoцитos aplastados durante la segunda división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Intercinesis. Topo II se detecta sobre los cromocentros mientras que SYCP3 adquiere forma de barras. (E-L) Metafase-II y anafase-II temprana. Topo II se distribuye como intensas barras en los centrómeros mientras que en estas etapas no se detecta marcaje de SYCP3. (M-P) Telofase-II. Las señales de Topo II sobre las regiones centroméricas se hacen cada vez más difusas mientras que no se detecta marcaje de SYCP3. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 3  $\mu$ m.

Al analizar la distribución relativa de Topo II y SYCP3 en preparaciones de espermátocitos esparcidos (Fig. 51 y 52) pudimos corroborar los mismos resultados que hemos comentado previamente para las preparaciones de aplastado (Fig. 49 y 50). Es interesante destacar que con la técnica de esparcido se pueden apreciar con más claridad los ELs marcados con SYCP3 durante la profase-I meiótica, y cómo las señales centroméricas de Topo II se localizan en sus extremos centroméricos (Fig. 51 A-H).



**Figura 51.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y SYCP3 (rojo) en espermátocitos esparcidos en diferentes etapas de la primera división meiótica. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Paquítena y diplotena. SYCP3 marca los ELs sinapsados y desinapsados, mientras que Topo II marca los cromocentros. (E-F) Diacinesis. SYCP3 marca intensas señales en los centrómeros así como en los ELs desinapsados, mientras que Topo II se detecta en los centrómeros. (G-H) Metafase-I. SYCP3 marca una señal en forma de "T" en los centrómeros y una señal parcheada en el dominio intercromatídico, mientras que Topo II marca unas señales redondeadas bajo los cinetocoros hermanos y una leve señal parcheada sobre los ejes cromatídicos (detalle en G). La barra de medida en H representa 5µm.



**Figura 52.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y SYCP3 (rojo) en espermatocitos esparcidos en anafase-I (A, B), intercinesis (C, D) y metafase-II (E, F). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-B) Anafase-I. Topo II se detecta como señales redondeadas en los centrómeros, mientras que SYCP3 aparece como pequeñas señales sobre algunos centrómeros. (C, D) Intercinesis. Topo II marca los cromocentros y SYCP3 aparece como barras. (E-F) Metafase-II. Topo II se detecta como señales redondeadas en los centrómeros, mientras que en esta etapa no se aprecia marcaje de SYCP3. La barra de medida en F representa 5  $\mu$ m.



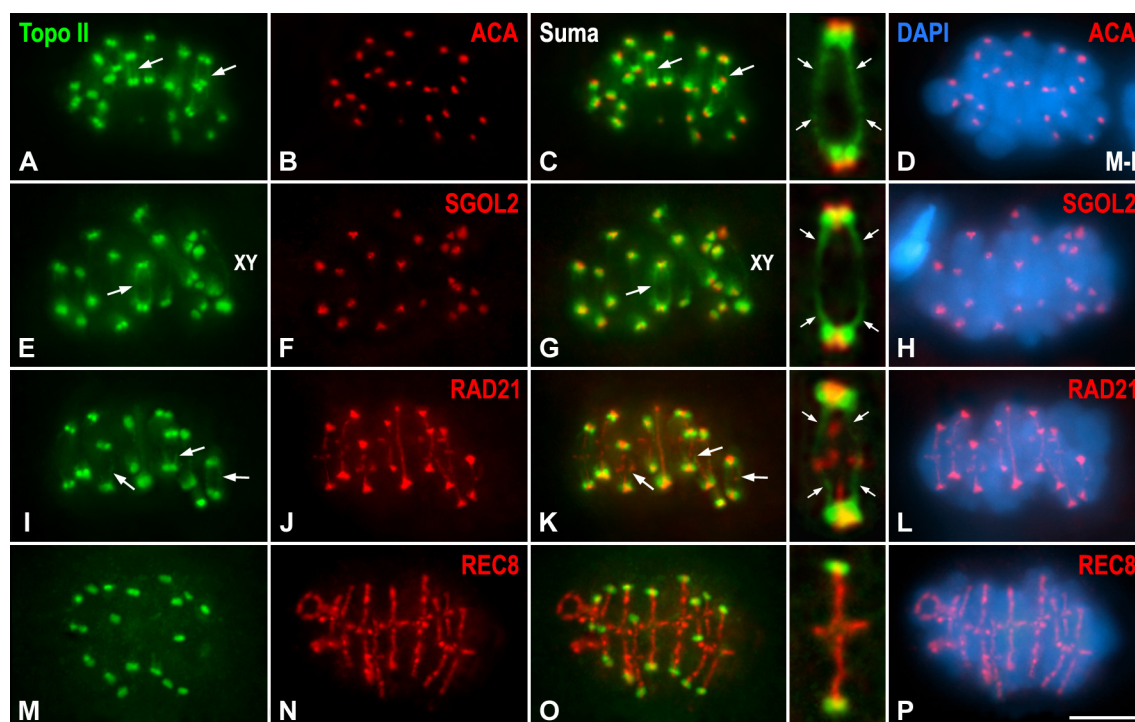
### 6.5. Distribución relativa de Topo II y otras proteínas

A continuación analizamos las distribuciones relativas de Topo II, cinetocoros, SGOL2 y las cohesinas RAD21 y REC8 sobre aplastados de túbulos seminíferos. Las dobles inmunodetecciones se centraron en el estudio de espermátocitos en metafase-I y en metafase-II. De este modo, podremos observar en qué medida las señales de las proteínas estudiadas colocalizan con las señales de Topo II en el centrómero y cuáles son sus posiciones relativas en los brazos cromosómicos en cromosomas meióticos condensados.

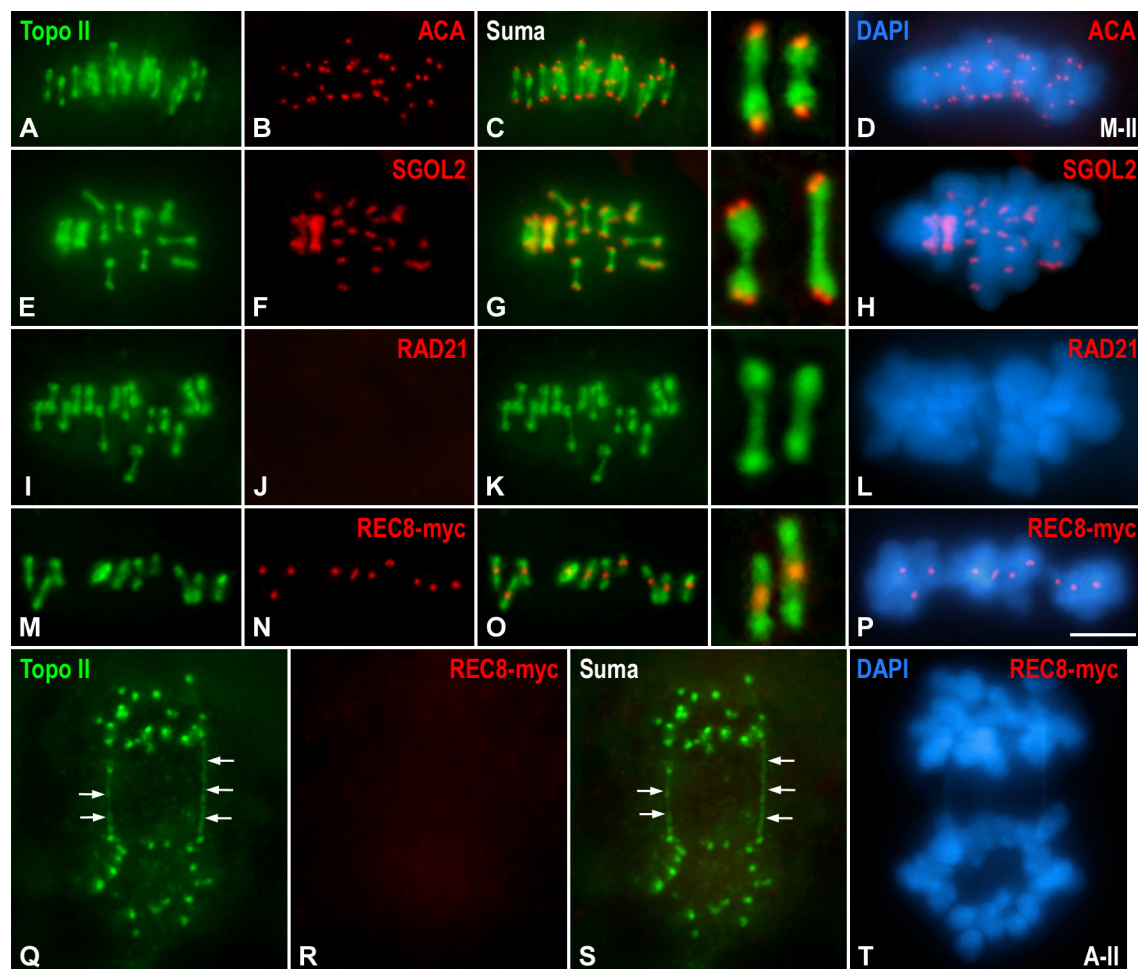
Tal y como hemos descrito en apartados anteriores, en metafase-I Topo II se localiza en los centrómeros en forma de dos señales redondeadas bajo los cinetocoros hermanos así como en los ejes cromatídicos (Fig. 53 A-D). Con respecto a SGOL2, podemos observar la colocalización parcial con Topo II en la parte inferior de la señal transversal de la “T” centromérica de SGOL2, así como la colocalización prácticamente total en la parte vertical de la “T” (Fig. 53 E-H). Este mismo patrón de colocalización también puede observarse con RAD21 (Fig. 53 I-L) ya que ésta tiene una distribución en el centrómero idéntica a SGOL2. Es muy interesante observar la distribución relativa de RAD21 y Topo II en los brazos cromosómicos en metafase-I, ya que RAD21 marca el dominio intercromatídico mientras que Topo II marca los ejes cromatídicos (Fig. 53 K). Por último, analizamos la distribución relativa de Topo II y REC8. En este caso, vemos que la pequeña señal de REC8 que invade el centrómero sí colocaliza con las señales redondeadas de Topo II (Fig. 53 M-P). Hay que comentar que tras varios intentos nunca pudimos observar un marcaje suficientemente intenso de Topo II en los ejes cromatídicos al realizar las dobles inmunodetecciones de Topo II y REC8, motivo por el cual no pueden apreciarse en las imágenes mostradas.

La señal de Topo II en metafase-II consiste en bandas transversales que conectan los dos cinetocoros hermanos y que son más gruesas en sus extremos que por la parte central (Fig. 54 A-D). Con respecto a SGOL2, vemos que existe un solapamiento de las bandas de Topo II con los dos puntos bajo cada cinetocoro que se marcan con SGOL2 (Fig. 54 E-H). Ya que nunca hemos detectado RAD21 en metafase-II no podemos hablar de ninguna distribución relativa con Topo II (Fig. 54 I-L). Por último, es muy interesante comentar la distribución relativa de Topo II y REC8 en metafase-II y anafase-II, lo cual fue analizado mediante la doble localización de Topo II y REC8-*myc*. Las pequeñas señales de REC8-*myc* que persisten en metafase-II (Fig. 54 M-P) se

localizan justo en el medio de la banda de Topo II. Cuando las cromátidas segregan en anafase-II temprana, la señal de REC8 desaparece, pero sí que podemos seguir observando hebras muy alargadas de Topo II conectando algunas parejas de cinetocoros hermanos (Fig. 54 Q-T). Este último resultado indica que la cohesina REC8 se pierde de los centrómeros antes de que se hayan resuelto las concatenaciones de DNA en la anafase-II temprana.



**Figura 53.** Dobles inmunolocalizaciones de Topo II (verde) junto con los cinetocoros (ACA, rojo) (A-D), SGOL2 (rojo) (E-H), RAD21 (rojo) (I-L) y REC8 (rojo) (M-P) en espermátocitos aplastados en metafase-I. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Los detalles muestran a mayor aumento diferentes bivalentes autosómicos seleccionados, en los que se ha detectado Topo II en relación al resto de proteínas analizadas. Las flechas indican las señales de Topo II sobre los ejes cromatídicos. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 5  $\mu$ m.

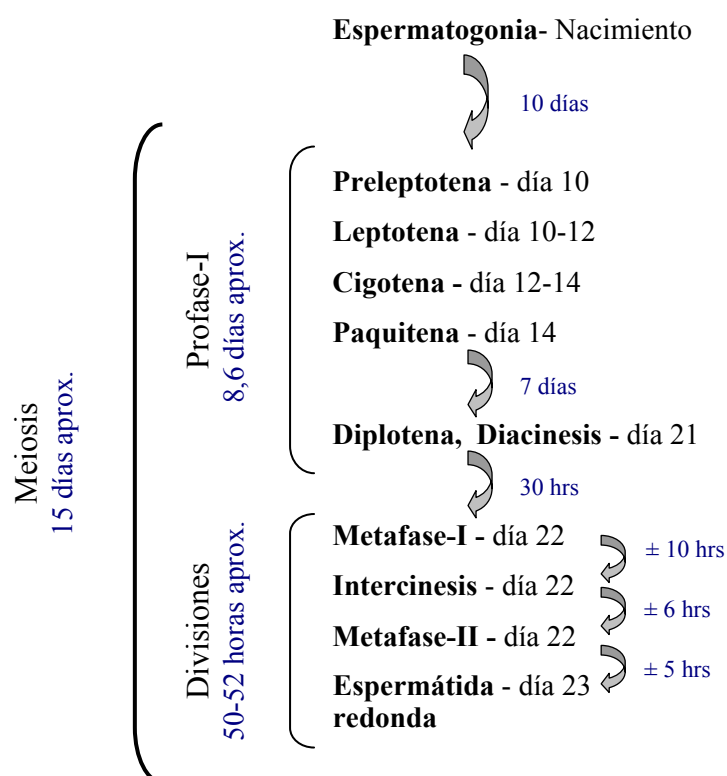


**Figura 54.** Dobles inmunolocalizaciones de Topo II (verde) junto con los cinetocoros (ACA, rojo) (A-D), SGOL2 (rojo) (E-H), RAD21 (rojo) (I-L) y REC8-*myc* (rojo) (M-P) en espermátocitos aplastados en metafase-II y doble inmunolocalización de Topo II (verde) y REC8-*myc* (rojo) en anafase-II (Q-T). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-P) Metafase-II. Los detalles muestran a mayor aumento las regiones centroméricas de diferentes cromosomas seleccionados, en los que se ha detectado Topo II en relación al resto de proteínas analizadas. (Q-T) Anafase-II. La flechas en Q y S indican las hebras de Topo II que aparecen conectando cinetocoros hermanos. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en T representa 3  $\mu$ m.

### 6.6. Análisis de espermátocitos de ratón tratados con Etopósido

Para analizar el efecto del inhibidor Etopósido (ET) sobre la actividad de la Topo II durante la meiosis de ratón se procedió a realizar inyecciones intraperitoneales (*i.p.*) en 20 individuos adultos o juveniles. Para acotar la edad en la que decidimos realizar el tratamiento de ET consultamos la bibliografía existente y seleccionamos individuos juveniles en los cuales todos los espermátocitos se encontraban en la primera onda meiótica o bien individuos ya adultos (Bellve y col., 1977; Moses y Masui, 1990; Kallio y Lahdetie, 1996; Kallio y Lahdetie, 1997; Tepperberg y col., 1997). Repasando todas estas publicaciones elaboramos el siguiente esquema en el que se representa la duración

de la primera onda meiótica en ratón. Utilizando este cronograma pudimos hacernos una idea de en qué momento se encontraban los espermatoцитos de los individuos juveniles que se sometieron al tratamiento y en qué etapa podrían encontrarse en el momento de su procesamiento (ver Esquema 10).



**Esquema 10.** Cronograma de la primera onda meiótica en machos de ratón.

Para acotar la concentración óptima de ET a utilizar en los experimentos de inhibición de Topo II nos remitimos a la bibliografía existente hasta el momento (Kallio y Lahdetie, 1996; Kallio y Lahdetie, 1997; Russell y col., 2000; Marchetti y col., 2001; Tateno y Kamiguchi, 2001; Russell y col., 2004) y llegamos a la conclusión de que el procedimiento óptimo sería realizar pruebas de inyecciones *i.p.* a concentraciones de 50 mg/kg, 60 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg de ET disuelto en DMSO (Dimetil Sulfóxido). También se hicieron varias pruebas de individuos control que no se habían sometido a ningún tratamiento para comprobar los porcentajes de etapas meióticas según la edad. Asimismo, se realizó una prueba de inocuidad del DMSO inyectando a un ratón control el mismo volumen de disolvente que a los individuos tratados. Tras esta

prueba y realizando diversas inmunolocalizaciones de proteínas bien conocidas (imágenes no mostradas) llegamos a la conclusión de que el DMSO no afecta al desarrollo de la meiosis de ratón.

En primer lugar quisimos hacer una aproximación al estudio realizando diferentes pruebas en individuos juveniles y adultos con diferentes concentraciones de ET con objeto de observar qué efectos produce el ET sobre la meiosis de ratón. En la siguiente tabla se presenta un resumen de las observaciones obtenidas para cada uno de los 20 individuos analizados. La tabla está ordenada en función de la edad de los individuos y dentro de cada grupo de edad según concentración creciente de la droga, y a su vez por el tiempo de duración del tratamiento.

Edad	Dosis	Tiempo	Observaciones
<b>Individuo 1:</b> 19 días	Control	-----	Predominantemente aparecen células en profase-I.
<b>Individuo 2:</b> 19 días	50 mg/kg	72 horas	Apoptosis, cigotenas con fallos en condensación, MI bloqueadas, retrasos en anafase-I y II. Mitosis normal.
<b>Individuo 3:</b> 19 días	50 mg/kg	96 horas	Apoptosis, cigotenas con fallos en condensación, MI bloqueadas, retrasos en anafase-I y II. Mitosis normal.
<b>Individuo 4:</b> 19 días	80 mg/kg	Muerto en 1 hora	-----
<b>Individuo 5:</b> 20 días	60 mg/kg	Muerto en 48 horas	-----
<b>Individuo 6:</b> 22 días	Control	-----	Pueden observarse todas las etapas de la meiosis.
<b>Individuo 7:</b> 23 días	Control	-----	Pueden observarse todas las etapas de la meiosis.
<b>Individuo 8:</b> 24 días	50 mg/kg	5 horas	Apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermátidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 9:</b> 24 días	50 mg/kg	5 horas	Apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermátidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 10:</b> 24 días	50 mg/kg	24 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermátidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 11:</b> 24 días	50 mg/kg	48 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermátidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 12:</b> 24 días	60 mg/kg	24 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermátidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 13:</b> 28 días	50 mg/kg	5 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermátidas anómalas. Mitosis normal.



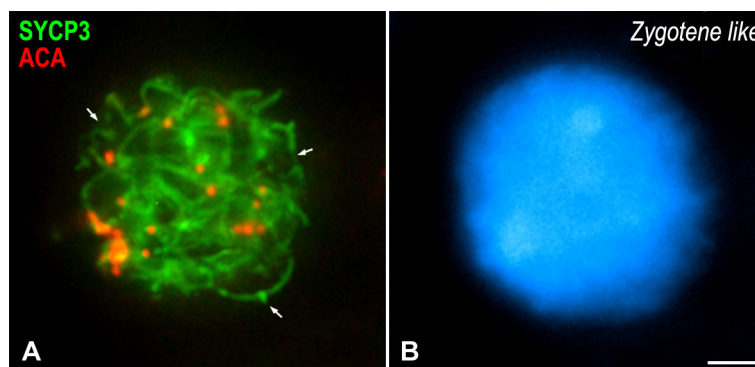
<b>Individuo 14:</b> 28 días	50 mg/kg	24 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermatidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 15:</b> 28 días	50 mg/kg	48 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermatidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 16:</b> adulto	80 mg/kg	24 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermatidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 17:</b> adulto	100 mg/kg	24 horas	No funcionó la inhibición.
<b>Individuo 18:</b> adulto	100 mg/kg	24 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermatidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 19:</b> adulto	100 mg/kg	48 horas	Alta apoptosis, univalentes en MI puentes, puentes, retrasos y fragmentos en anafase-II, espermatidas anómalas. Mitosis normal.
<b>Individuo 20:</b> adulto	200 mg/kg	24 horas	Apoptosis muy elevada, casi ninguna célula normal.

**Tabla 10.** Resumen de los resultados obtenidos tras los tratamientos con ET.

Una vez realizadas todas las pruebas se pusieron en común los resultados para analizar qué anomalías cromosómicas aparecen más frecuentemente tras la inhibición de Topo II con ET. A continuación se explican con más detalle las anomalías comunes más significativas que pudimos observar en los individuos tratados con ET:

- En profase-I pudimos observar en algunos casos cigotenas con fallos en la condensación (Fig. 55). Estas cigotenas a las que llamamos “*zygotene like*” fueron detectadas únicamente en los individuos 2 y 3, cuya edad era de 19 días y que fueron tratados con 50 mg/kg durante 72 y 96 horas respectivamente. Según nuestro cronograma meiótico (Esquema 10), los espermatocitos que al sacrificar el animal estaban en cigotena se encontraban en etapa de preleptotena en el momento de administrar la droga. Tras realizar la inmunodetección de SYCP3 y los cinetocoros pudimos observar que en estas “*zygotene like*” aberrantes, SYCP3 se encuentra formando grumos y engrosamientos a lo largo de los EAs/ELs que no se aprecian nunca en esta etapa en individuos no tratados (Fig. 55 A), además de que el aspecto de la cromatina refleja una excesiva condensación y un aspecto deformado de los cromocentros (Fig. 55 B). En estos individuos tratados con ET a los 19 días no vimos ningún tipo de fallo en las paquitenas, puesto que ya que la paquitena dura alrededor de 7 días y que la droga se administró durante 72 y 96 horas, en el momento de la inyección de la

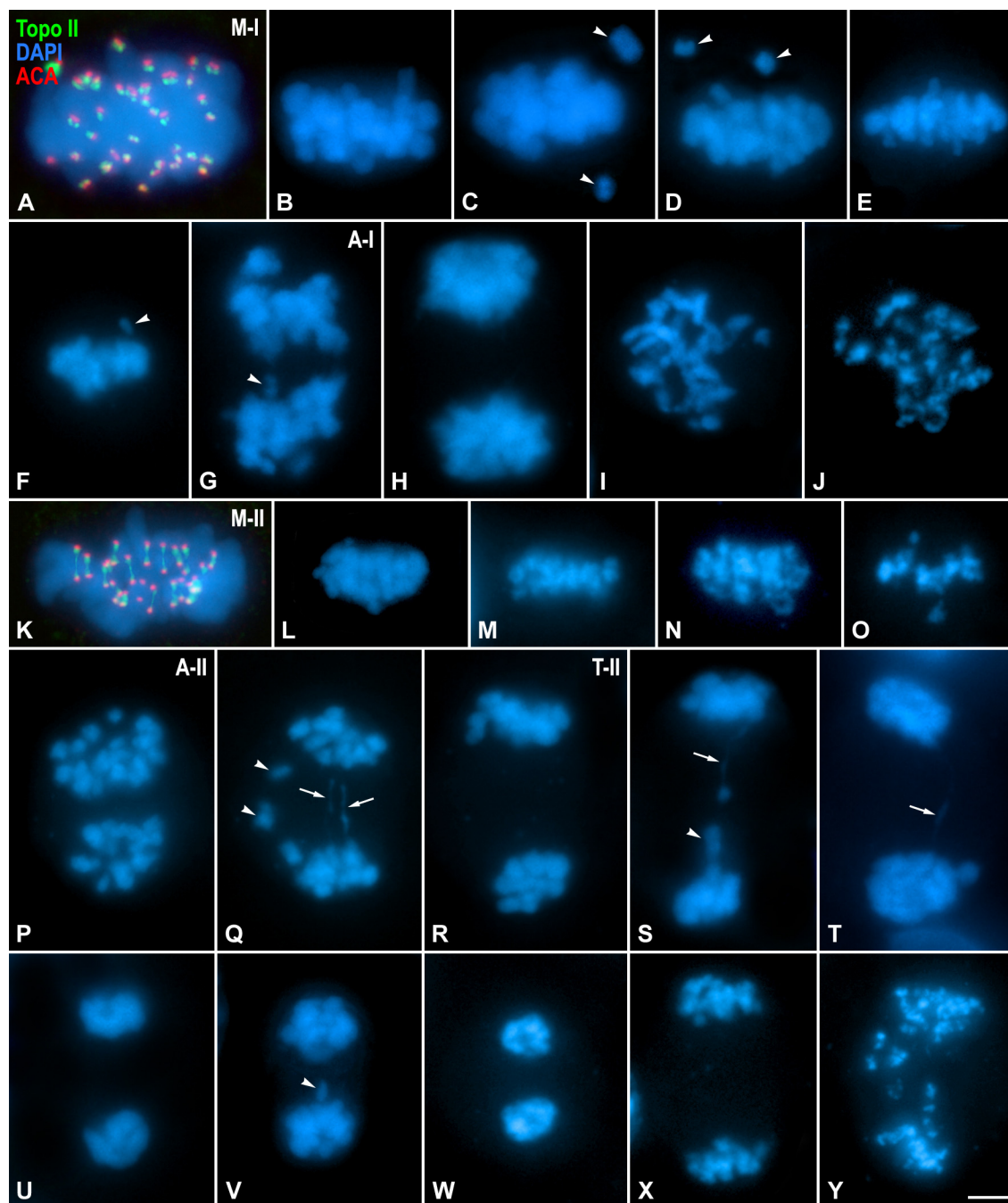
droga ya se encontraban en paquitena. De esto deducimos que si la droga se inyecta sobre preleptotena veremos fallos en la condensación de la cromatina en cigotena al cabo de 2/3 días, sin embargo no veremos efectos en condensación sobre las células que ya estaban en paquitena en el momento del tratamiento.



**Figura 55.** Doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en “zygotene like” tras el tratamiento con ET. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Las flechas indican engrosamientos amorfos de SYCP3 en los EAs. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida representa 2  $\mu$ m.

- En todos los individuos tratados con ET aparece un alto porcentaje de espermatocitos apoptóticos. Las apoptosis podía verse fundamentalmente durante las dos divisiones meióticas y en distintos grados de evolución, pues cuanto más avanzadas eran las apoptosis menor tamaño tenían las células y más intensidad podía apreciarse con el marcaje de DAPI de la cromatina (Fig. 56). A diferencia de las células no apoptóticas en las que podemos inmunodetectar Topo II y los cinetocoros (Fig. 56 A, K), en las células en apoptosis se pierden todas las señales de las proteínas (Fig. 56 B-J y L-Y). Únicamente cuando podíamos suponer por la morfología de la cromatina que la apoptosis era muy temprana, podíamos observar un leve marcaje de los cinetocoros (imágenes no mostradas) que desaparece más tarde en apoptosis más avanzadas.
- En todos los individuos tratados mayores de 23 días (individuos 8 al 20) observamos retrasos en la alineación de los bivalentes en metafase-I, lo que se visualiza como un número mucho mayor de células en prometafase-I que en individuos no tratados. También observamos en muchas ocasiones células en metafase-I con uno o varios bivalentes fuera de placa (Fig. 57 A, B).

- En todos los individuos tratados mayores de 23 días (individuos 8 al 20) observamos frecuentemente univalentes fuera de placa en metafase-I cuya incapacidad de orientar adecuadamente generalmente provoca la entrada en apoptosis (Fig. 56 C, D y Fig. 57 C).
- En todos los individuos tratados mayores de 23 días (individuos 8 al 20) observamos retrasos cromosómicos, puentes de cromatina (marcados con DAPI) y fragmentaciones cromosómicas en anafase-I/telofase-I (Fig. 56 G y Fig. 57 E-H). Los puentes cromosómicos se marcan intensamente con Topo II en las células no apoptóticas y pueden aparecer entre las masas de cromatina de los cromosomas homólogos que están segregando (Fig. 58 A-D) o entre dos de los cinetocoros no hermanos de la pareja de homólogos (Fig. 58 E-H). Es interesante mencionar aquí que generalmente aparecen sólo entre 1 y 4 puentes de cromatina en anafase-I/telofase-I, y que en ningún caso hemos encontrado multitud de puentes de cromatina o retrasos cromosómicos en anafase-I/telofase-I, lo que hace suponer que las células soportan un número escaso de retrasos en la segregación cuyos fallos son capaces de desencadenar la entrada en apoptosis (Fig. 56 G y Fig. 57 G, H).
- En la mayoría de los individuos se pudieron observar retrasos en la alineación de los cromosomas en metafase-II (Fig. 57 I-J) y en metafases-II apoptóticas (Fig. 56 L-O).
- En todos los individuos tratados mayores de 23 días (individuos 8 al 20) observamos retrasos y puentes de cromatina entre cromátidas en anafase-II y telofase-II (Fig. 56 Q, S, T, V, Y y Fig. 57 M-P). Estos puentes se marcan con Topo II en las células no apoptóticas y curiosamente conectan a los cinetocoros hermanos (Fig. 57 M, N y Fig. 59). En anafase-II y telofase-II tampoco hemos detectado nunca un número superior a 4 puentes de cromatina o retrasos en la segregación.
- En todos los individuos tratados mayores de 23 días (individuos 8 al 20) observamos espermátidas anómalas con morfologías y tamaños anormales ligados a posibles aneuploidías (imágenes son mostradas).



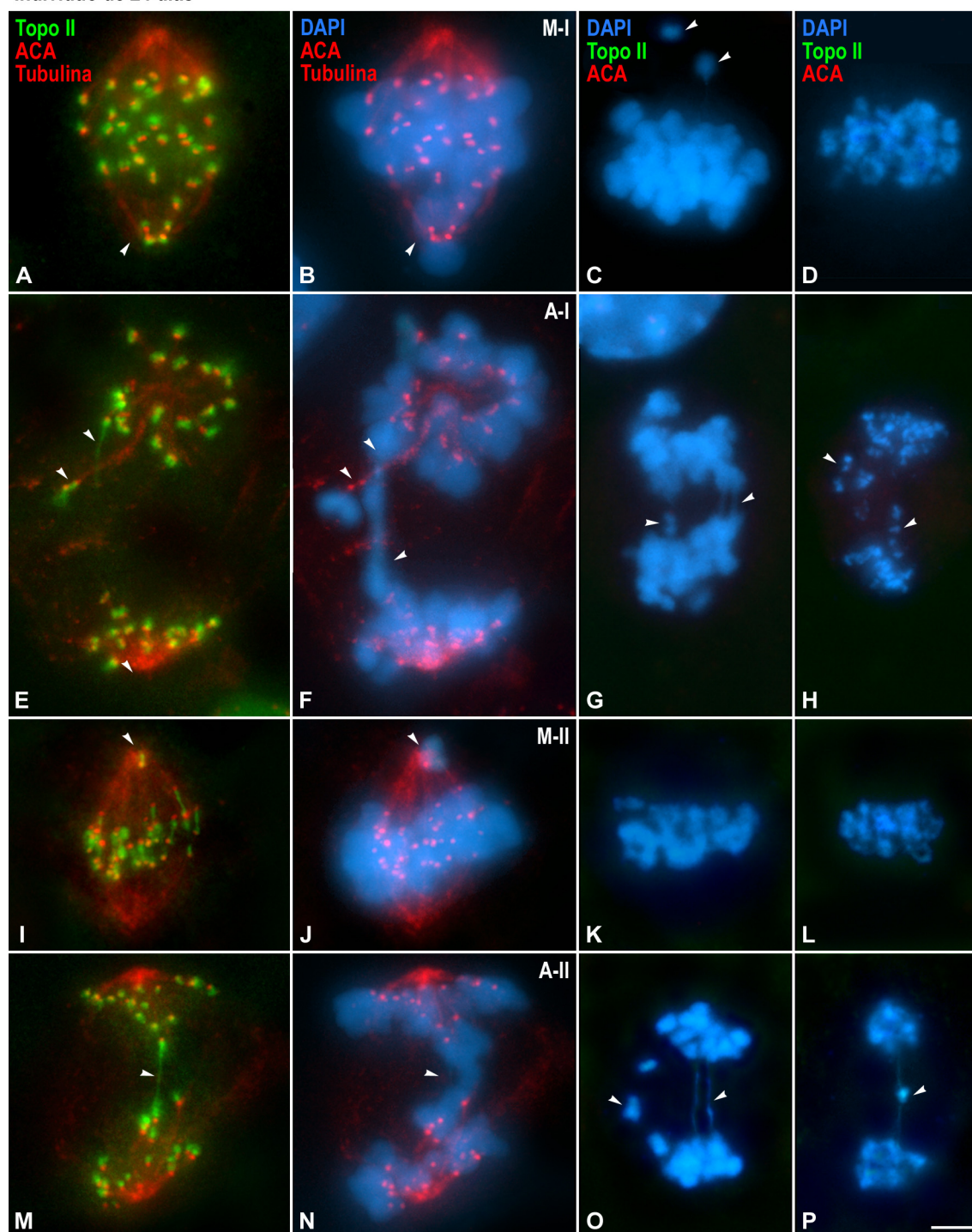
**Figura 56.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en metafase-I (A) y metafase-II (K) tras el tratamiento con ET. Progresión de la apoptosis en espermatocitos aplastados en las dos divisiones meióticas tras tratamiento con ET (B-J y L-Y). La cromatina se ha contrateñido con DAPI. Únicamente se detecta marcaje de Topo II y de los cinetocoros en las células vivas (A, K), mientras que no se observa señal sobre las células apoptóticas (B-J, L-Y). (C, D y F) Las cabezas de flecha indican bivalentes fuera de placa y/o univalentes en diferentes metafases-I apoptóticas. (G) La cabeza de flecha indica cromosomas retrasados en la zona media de la anafase-I apoptótica. (Q, S, T y V) Las flechas indican hebras de cromatina y fragmentos cromosómicos retrasados entre los dos polos celulares en diferentes anafases-II y telofases-II apoptóticas. Las cabezas de flecha indican cromosomas retrasados en la zona media. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en Y representa 3  $\mu$ m.



5 horas post tratamiento con ET (50mg/kg)

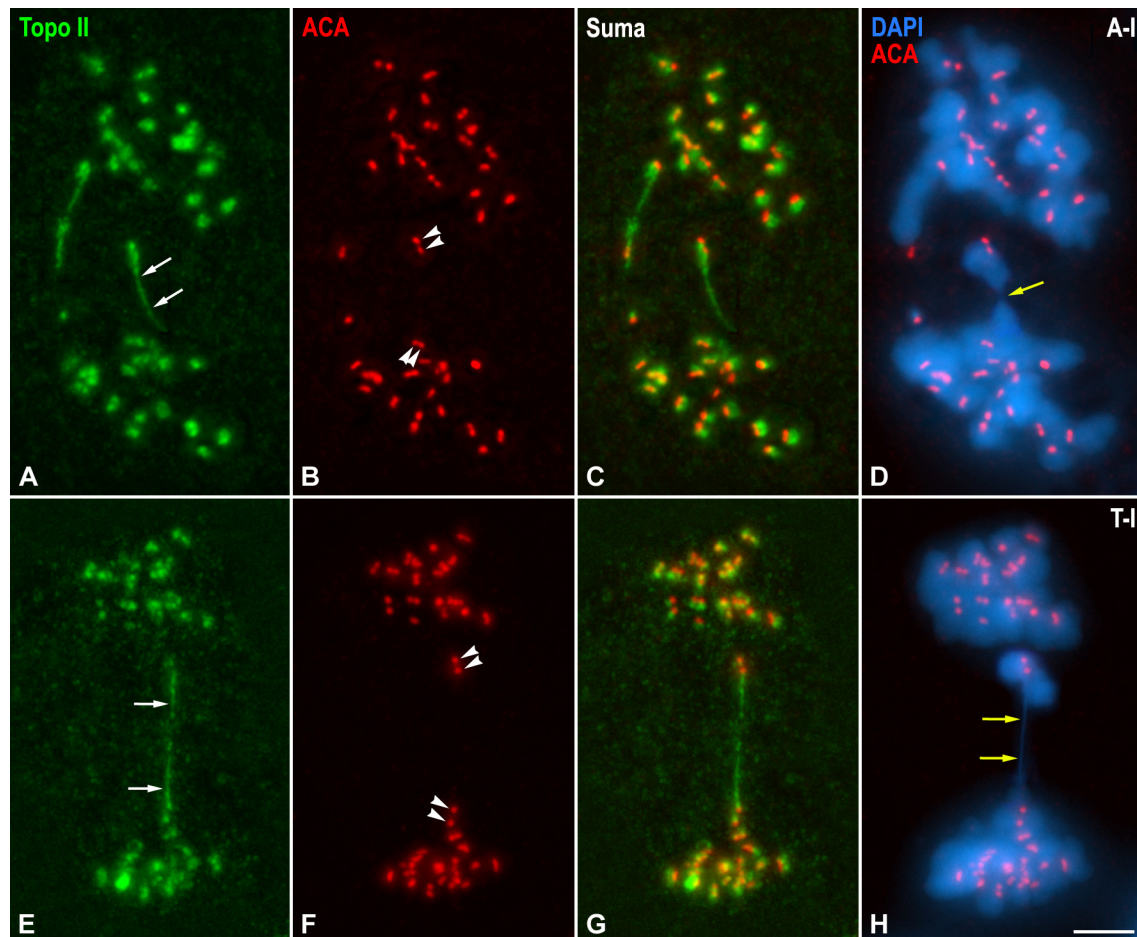
24 horas

Individuo de 24 días



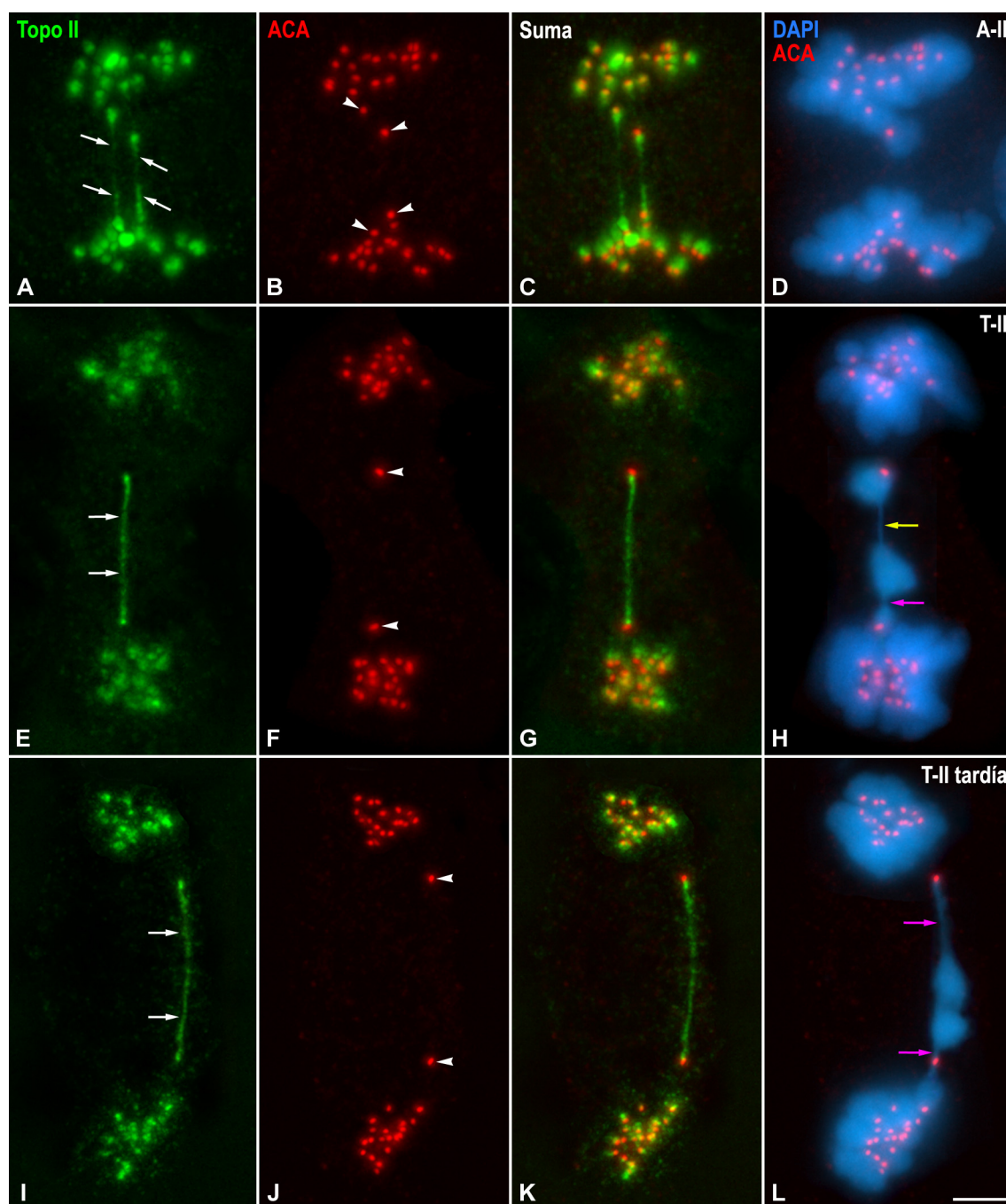
**Figura 57.** Triple inmunolocalización de Topo II (verde), Tubulina (rojo) y los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas meióticas tras el tratamiento con ET. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-P) Únicamente se detecta marcaje de Topo II y de los cinetocoros en las células vivas, mientras que no se observa señal sobre las células apoptóticas. (A, B) Metafase-I. Las cabezas de flecha indican dos bivalentes fuera de la placa ecuatorial. (C, D) Metafases-I apoptóticas. Las cabezas de flecha en C indican bivalentes fuera de placa y/o univalentes. (E, F) Anafase-I. Las cabezas de flecha indican cromosomas retrasados en la zona media de la célula y hebras de cromatina entre dos cromosomas homólogos. (G, H) Anafases-I apoptóticas. Las cabezas de flecha indican cromosomas retrasados, fragmentos de cromosomas y hebras de cromatina. (I, J) Metafase-II. La cabeza de flecha indica un cromosoma fuera de la placa ecuatorial. (K, L) Metafases-II apoptóticas. (M, N) Anafase-II. La

cabeza de flecha en M indica una hebra de Topo II entre dos cromátidas retrasadas que están segregando. (O, P) Anafases-II apoptóticas. Las cabezas de flecha indican puentes de cromatina y cromosomas retrasados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en P representa 3  $\mu$ m.



**Figura 58.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en anafase-I y telofase-I tras el tratamiento con ET. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Topo II marca los centrómeros y unas finas e intensas hebras (flechas blancas) que conectan cromosomas homólogos retrasados en anafase-I (A-D) y en telofase-I (E-H), y que se corresponden con hebras de cromatina (flechas amarillas en D y H). Las cabezas de flecha blancas en B y F indican las parejas de cinetocoros hermanos ligeramente separados en las parejas de homólogos que se están retrasando en su segregación. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en H representa 3  $\mu$ m.





**Figura 59.** Doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en anafase-II y telofase-II tras el tratamiento con ET. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A-D) Anafase-II. Topo II marca los centrómeros y unas finas e intensas hebras (flechas blancas) que conectan los cinetocoros (cabezas de flecha) de las cromátidas retrasadas. (E-H) Telofase-II. Las flechas blancas indican una hebra de Topo II que conecta los cinetocoros hermanos (cabezas de flecha blancas) de las cromátidas retrasadas que están segregando y que se corresponden con hebras de cromatina (flecha amarilla y rosa en H). (I-L) Telofase-II tardía. Las flechas blancas indican una hebra de Topo II que conecta los cinetocoros hermanos (cabezas de flecha blancas) de las cromátidas retrasadas y que se corresponden con hebras de cromatina (flechas rosas en L). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en L representa 3  $\mu$ m.

### 6.6.1. Estudio cuantitativo de los efectos del ET sobre la meiosis de ratón

Tal y como hemos explicado, las anomalías en las divisiones meióticas que pudimos observar tras la inhibición de Topo II con ET son comunes para todos los individuos tratados mayores de 23 días (individuos 8 a 20). Pudimos observar que el porcentaje de células degeneradas aumenta dependiendo de la concentración de ET, y después de analizar todos los resultados llegamos a la conclusión de que la concentración óptima de ET para la inhibición de Topo II en ratones adultos es de 50 mg/kg.

Para realizar un estudio cuantitativo de los efectos del ET realizamos un conteo de las anomalías comunes observadas en individuos tratados con 50 mg/kg de ET considerando como variable el tiempo que los individuos estuvieron sometidos a la droga. Para ello hicimos recuentos celulares en los individuos 9 y 13, 10 y 14, y 11 y 15, que fueron sometidos todos ellos a una inyección *i.p.* de ET a una concentración de 50 mg/kg durante 5, 24 y 48 horas respectivamente. Ya que los porcentajes de cada clasificación fueron muy similares para los dos individuos tratados durante el mismo tiempo, se han agrupado los resultados de los dos individuos de cada grupo para simplificar el análisis. Con los datos que obtuvimos pudimos realizar las siguientes tablas:

Individuos 9 y 13		5 horas ET 50 mg/kg		n
Metafase-I	Normal	272	67.16%	406
	Con univalentes	65	16.05%	
	Desalineada	20	4.9%	
	Apoptótica	30	7.4%	
	Apop. con univ.	19	4.7%	
Anafase-I/ Telofase-I	Normal	4	21%	19
	Retraso	12	63.15%	
	Apop. con retraso	1	5.26%	
	Apop. sin retraso	2	10.52%	
Metafase-II	Normal	97	82.9 %	117
	Desalineada	3	2.5%	
	Apoptótica	17	14.5%	
Anafase-II/ Telofase-II	Normal	14	53.8%	26
	Retraso	9	34.61%	
	Apop. con retraso	1	3.8%	
	Apop. sin retraso	2	7.6%	

**Tabla 11 A.** Porcentajes celulares tras tratamiento de 50 mg/kg de ET durante 5 horas.

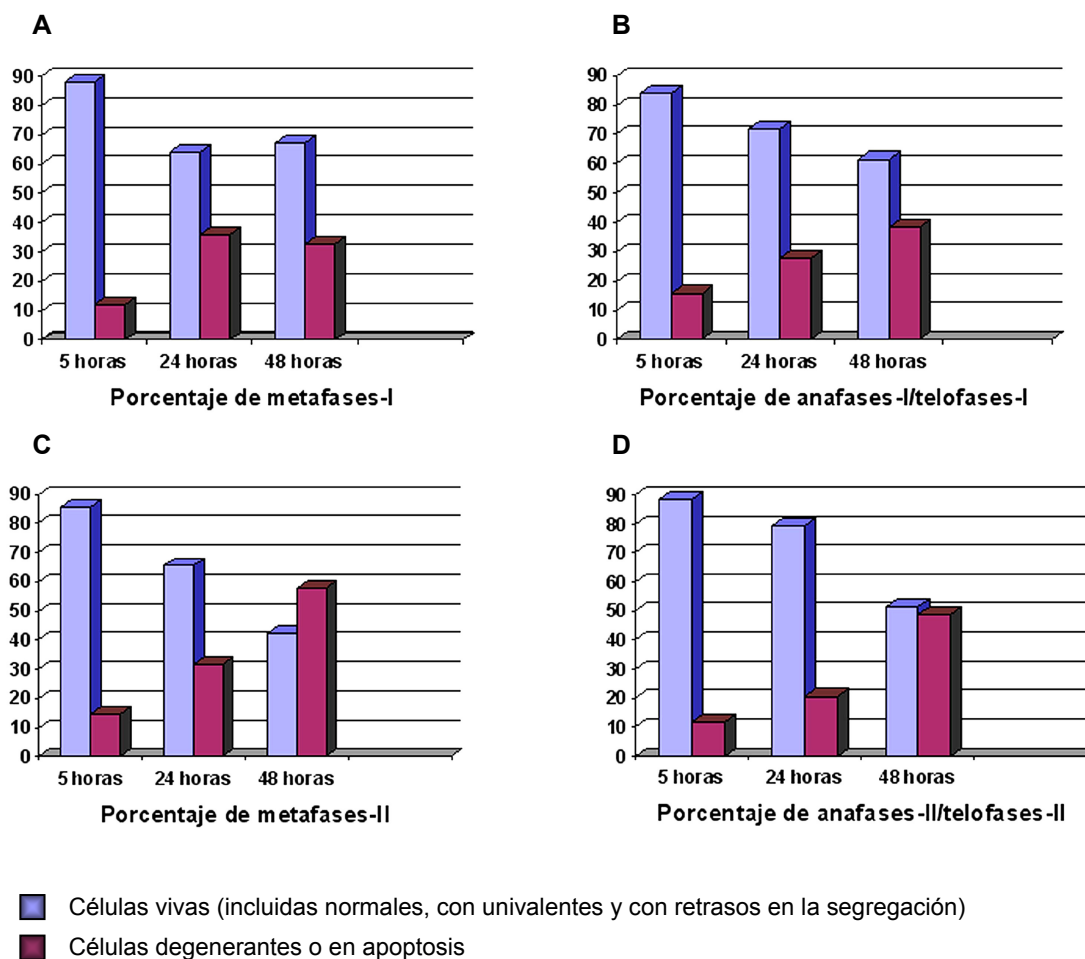


Individuos 10 y 14		24 horas ET 50 mg/kg		n
Metafase-I	Normal	177	46.57%	380
	Con univalentes	45	11.84%	
	Desalineada	21	5.52%	
	Apoptótica	87	22.8%	
	Apop. con univ.	50	13.15%	
Anafase-I/ Telofase-I	Normal	29	38.66%	75
	Retraso	25	33.33%	
	Apop. con retraso	11	14.66%	
	Apop. sin retraso	10	13.33%	
Metafase-II	Normal	124	66.33%	187
	Desalineada	4	2.13%	
	Apoptótica	59	31.55%	
Anafase-II/ Telofase-II	Normal	50	40.98%	122
	Retraso	47	38.52%	
	Apop. con retraso	14	11.47%	
	Apop. sin retraso	11	9.01%	

**Tabla 11 B.** Porcentajes celulares tras tratamiento de 50 mg/kg de ET durante 24 horas.

Individuos 11 y 15		48 horas ET 50 mg/kg		n
Metafase-I	Normal	236	49.68%	475
	Con univalentes	43	9.05%	
	Desalineada	41	8.63%	
	Apoptótica	84	17.68%	
	Apop. con univ.	71	14.94%	
Anafase-I/ Telofase-I	Normal	27	34.61%	78
	Retraso	21	26.92%	
	Apop. con retraso	17	21.79%	
	Apop. sin retraso	13	16.66%	
Metafase-II	Normal	85	55.19%	154
	Desalineada	2	1.29%	
	Apoptótica	67	18.83%	
Anafase-II/ Telofase-II	Normal	25	35.71%	70
	Retraso	11	15.71%	
	Apop. con retraso	18	25.71%	
	Apop. sin retraso	16	22.85%	

**Tabla 11 C.** Porcentajes celulares tras tratamiento de 50 mg/kg de ET durante 48 horas.



**Tablas y Gráficos 11.** Las Tablas 11A, 11B y 11D indican los porcentajes de células en cada etapa en individuos tratados con 50 mg/kg de ET durante 5, 24 o 48 horas. Los Gráficos 11 A, 11B, 11C y 11D representan los porcentajes de células vivas frente a células en apoptosis por cada etapa celular con el tratamiento con ET a diferentes tiempos.

En el Gráfico 11 se puede apreciar a grandes rasgos que el porcentaje de células degenerantes o apoptóticas va aumentando progresivamente cuanto mayor es el tiempo de tratamiento con ET para todas las etapas. Un caso especial son las metafases-I, en las que el número de células apoptóticas fue mayor a las 24h de tratamiento (36.0%) que a las 48h (33.63%) (Gráfico 11A). Esto puede ser por el sesgo que se produce en la selección de campos celulares de conteo en las preparaciones, en los que dependiendo de los túbulos que hayan sido aplastados podremos tener más células en unas etapas o en otras.

Respecto al porcentaje de metafases-I con univalentes es curioso observar como disminuye el porcentaje de las mismas a medida que aumenta el tiempo de tratamiento (ver Tablas 11A, B y C), sin embargo, aumentan las metafases-I apoptóticas con

univalentes (Gráfico 11A). Ambos datos pueden estar correlacionados ya que las metafase-I con univalentes que existen a las 5h de tratamiento (Tabla 11A) las observaremos como metafases-I apoptóticas con univalentes a las 48h de tratamiento (Tabla 11C). Basándonos en el cronograma meiótico que hemos elaborado (Esquema 10) hay que clarificar aquí que 24 horas no son suficientes para que entren gran cantidad de células a metafase-I que estuvieran en diacinesis, ya que el tiempo medio entre diacinesis y metafase-I en la meiosis de ratón es de unas 30 horas.

Es interesante resaltar también que el porcentaje de anafases-I/telofases-I con retrasos en la segregación disminuye a mayor tiempo de tratamiento (ver Tablas 11 A, B y C), y aumentan sin embargo el porcentaje de anafases-I/telofases-I apoptóticas con retrasos (Gráfico 11 B). Puede suponerse también que esas anafases-I/telofases-I con retrasos que aparecen a las 5h de tratamiento entrarían en apoptosis a tiempos más largos de actuación de la droga.

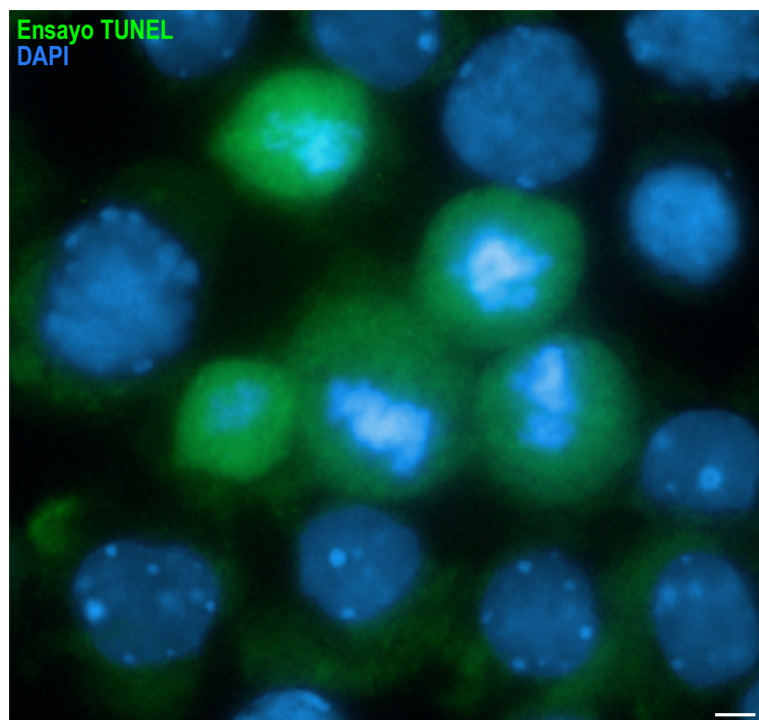
Por otro lado hay que mencionar también que el porcentaje de metafases-II con retrasos en la alineación (lo que se corresponde también con un número mayor de prometafases-II) aumenta considerablemente a mayor tiempo de tratamiento (ver Tablas 11 A y C). El porcentaje de metafases-II apoptóticas aumenta cuanto mayor es el tiempo de exposición a la droga (Gráfico 11 C).

Por último, el porcentaje de anafases-II/telofases-II con retrasos en la segregación disminuye también a mayor tiempo de tratamiento (ver Tablas 11 A y C), y aumentan sin embargo el porcentaje de anafases-II/telofases-II apoptóticas (Gráfico 11 D). Por tanto, puede suponerse también que esas anafases-II/telofases-II con retrasos que aparecen a las 5h de tratamiento entrarían en apoptosis a tiempos más largos de actuación de la droga.

#### **6.6.2. Ensayo TUNEL**

Por último, para poder comprobar que las células que considerábamos que estaban en apoptosis realmente se encontraban en este proceso fisiológico realizamos un ensayo TUNEL (*TdT-mediated dUTP-X nick End Labeling*) sobre aplastados de espermatoцитos del individuo 3, el cual fue tratado con 50 mg/kg de ET durante 96 horas. El resultado fue que las células en apoptosis se marcaban mediante una reacción enzimática que añade nucleótidos marcados con fluoresceína a las roturas de DNA que se producen durante la muerte celular programada (Fig. 60). En este punto, debemos comentar que el

resultado que obtuvimos con el ensayo TUNEL es dudoso ya que como puede observarse en la Figura 60, si bien se marcan intensamente únicamente los espermatocitos apoptóticos, éste marcaje no es sólo en la cromatina sino también en todo el citoplasma.



**Figura 60.** Ensayo TUNEL (verde) en espermatocitos aplastados tras el tratamiento con ET. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Se observa un intenso marcaje tanto a nivel nuclear como citoplasmático en las células apoptóticas. La imagen es una proyección en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida representa 5  $\mu$ m.

---

### 6.7. Distribución de proteínas reguladoras de Topo II

Para poder dilucidar algunos de los aspectos funcionales de la Topo II intentamos realizar inmunodetecciones de algunas de las proteínas reguladoras de las que pudimos disponer. Hemos intentado realizar la inmunodetección de SUMO2/3, SUMO E2 (comúnmente llamada UBC9), las SUMO E3 ligasas RanBP2 y PIAS $\gamma$ , y la nucleoporina RanGAP1 con los anticuerpos que se detallan en la Tabla 2 del apartado Material y Métodos.

Tras realizar las dobles inmunodetecciones de dichas proteínas junto con los cinetocoros encontramos que SUMO2/3 únicamente se localiza en los cromocentros en paquitenia y diplotena, sin embargo, no encontramos señal en los centrómeros más allá de diacinesis (imágenes no mostradas). Tras analizar las SUMO E3 ligasa RanBP2 y su proteína activadora RanGAP1 (*RAN GTPasa Activating Protein 1*) obtuvimos, como era de esperar por su condición de nucleoporinas, un patrón de marcaje de los complejos de

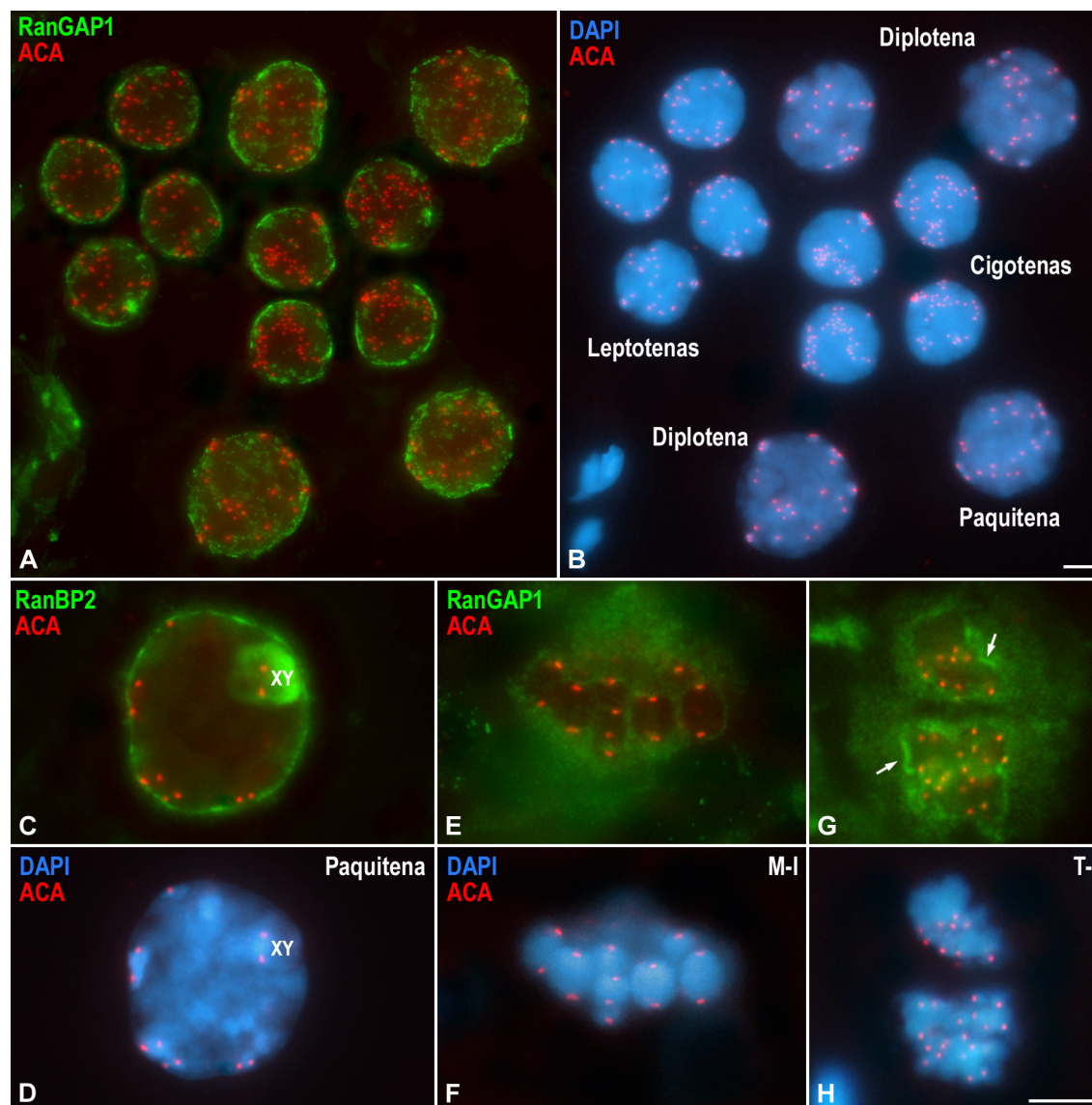
poro en la EN en profase-I (Fig. 61 A, B), marcándose además intensamente el cuerpo XY con RanBP2 en paquitena (Fig. 61 C, D). En estas imágenes hay que explicar que lo que se muestra en el caso de la Fig. 61 A y B es una proyección de alrededor de 70 planos focales de toda la célula y por eso se marca todo el volumen del núcleo, pero las señales de los complejos de poro en cada plano lógicamente aparecían sólo en la periferia nuclear. Analizando la distribución de estas dos nucleoporinas hemos podido observar un fenómeno muy curioso. Vemos que la desorganización de la EN, la cual ocurre previamente a la metafase-I, deja restos de la misma en el citoplasma que rodea a los bivalentes (Fig. 61 E, F). Por otro lado, en telofase-I y también en telofase-II vemos que la EN se reorganiza alrededor de los cromosomas (Fig. 61 G, H). Sin embargo, y en contra de lo que se ha descrito previamente en mitosis (Joseph y col., 2002; Dawlaty y col., 2008), no hemos encontrado señal de ninguna de estas proteínas en los centrómeros en metafase-I o metafase-II.

Tras hacer pruebas con varios anticuerpos no pudimos obtener resultados positivos ni con los anticuerpos contra PIAS $\gamma$  ni con los anticuerpos contra UBC9.

Por último, ya que la proteína PICH ha sido localizada en finos puentes de cromatina que conectan cromátidas hermanas separadas en células HeLa en anafase (Baumann y col., 2007), y que el corte y resolución de dichos puentes es llevado a cabo por la Topo II (Spence y col., 2007), decidimos que sería muy interesante analizar cuál es la localización de esta proteína en meiosis y comprobar si, en el caso de aparecer también esos puentes entre cromátidas, colocalizan con los puentes de Topo II que nosotros observamos en anafase-II temprana (Fig. 46 M-P).

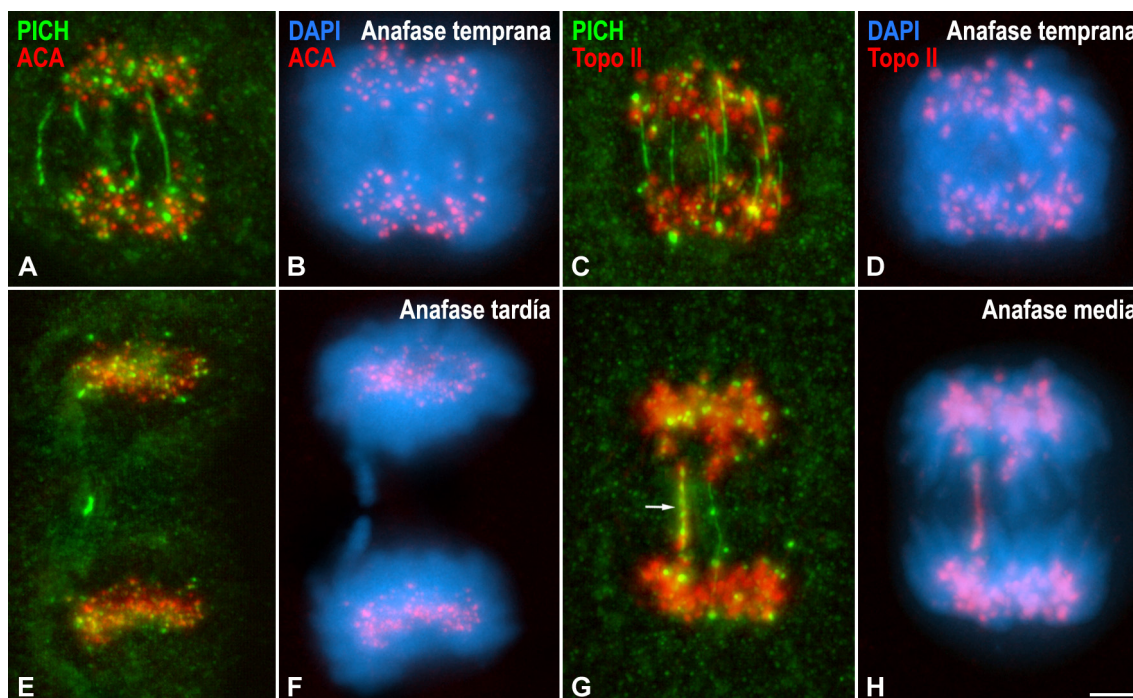
Para ello, utilizamos el anticuerpo contra PICH cedido por el Dr. Nigg (ver Tabla 2 en Material y Métodos), pero tras realizar su detección sobre túbulos seminíferos aplastados no pudimos detectar ningún tipo de marcaje. Para comprobar si efectivamente esos puentes de PICH podían ser detectados en la anafase mitótica de células de ratón, procedimos a inmunodetectar PICH en células PAM212, que es una línea de queratinocitos epidérmicos murinos immortalizada. Al inmunolocalizar doblemente PICH y los cinetocoros pudimos detectar que PICH aparece en puentes entre las cromátidas en anafase, que pueden aparecer en concreto conectando centrómeros (Fig. 62 A, B) o telómeros (Fig. 62 E, F). También realizamos la doble inmunodetección de PICH y Topo II, volviendo a encontrar puentes de PICH entre

centrómeros (Fig. 62 C, D) o telómeros, y que en escasísimas ocasiones coincidían con puentes de Topo II (Fig. 62 G, H).



**Figura 61.** Doble inmunolocalización de RanGAP1 y RanBP2 (verde) junto con los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas meióticas. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) RanGAP1 marca la periferia nuclear en todas las etapas de la profase-I, en la que pueden apreciarse las señales cinetocóricas ancladas a la EN. (C, D) Paquitena. RanBP2 marca la EN y todo el volumen del cuerpo sexual (XY). (E, F) Metafase-I. RanGAP1 marca levemente el citoplasma, pero no se observa señal en los centrómeros. (G, H) Telofase-I. RanGAP1 marca la EN que se está reconstituyendo alrededor de los cromosomas localizados en los polos de la célula (flechas blancas). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. Las barras de medida en B y H representan 5  $\mu$ m.





**Figura 62.** Doble inmunolocalización de PICH (verde) y de los cinetocoros (ACA, rojo) (A, B, E, F) y PICH (verde) y Topo II (rojo) (C, D, G, H) en anafases de células Pam212. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). PICH marca hebras entre las cromátidas hermanas segregando en anafase que pueden conectar cinetocoros hermanos (A-D y G-H), o telómeros (E-F). Las hebras de PICH colocalizan en escasísimas ocasiones con hebras de Topo II (flecha en G). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en H representa 2  $\mu$ m.

## 7. Distribución de Ciclina A

Las ciclinas son una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular cuya función principal es la activación de quinasas dependientes de ciclinas. La concentración de las ciclinas varía con el ciclo celular, cuando su concentración es baja la función de su correspondiente quinasa dependiente de ciclina es inhibida. Hay varios tipos de ciclinas: CyA, CyB, CyD y CyE. La Ciclina A (CyA) se expresa en ovocitos de ratón (Persson y col., 2005), pero su distribución y función exactas son aún desconocidas. Recientemente se ha generado un modelo de ratón mutante para CyA, el cual bloquea su meiosis en diplotena (Nickerson y col., 2007). Por estos motivos creímos que sería muy interesante analizar la distribución de la CyA en la meiosis de machos de ratón.

Para poder analizar la distribución de CyA realizamos la doble inmunolocalización de CyA junto con SYCP3 en preparaciones de aplastado de túbulos seminíferos de ratón (Fig. 63) y de esparcido de espermatoцитos (Fig. 64).

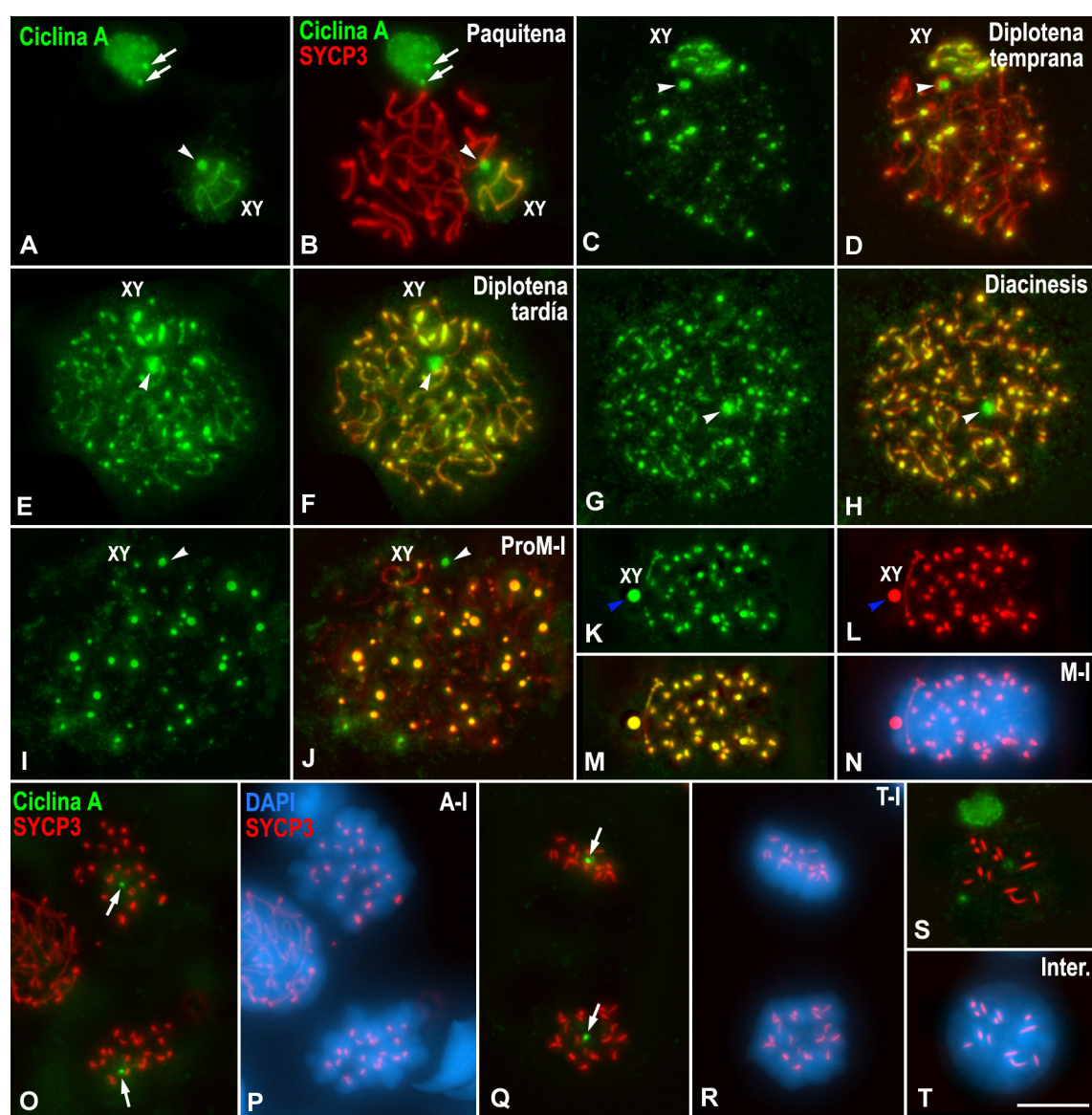
En las preparaciones de aplastado pudimos observar que en paquitena CyA marca intensamente una región fuera del núcleo en la que se diferencian con más intensidad dos pequeños puntos (flechas en Fig. 63 A, B), éste marcaje podría presumiblemente corresponder a la región donde se sitúan los centriolos. Además, en paquitena también se marca intensamente todo el volumen del cuerpo sexual y los EAs del bivalente XY (Fig. 63 A, B), así como una pequeña e intensa señal redondeada localizada al lado del cuerpo XY que se corresponde con el cuerpo denso del nucleolo (cabeza de flecha en Fig. 63 A, B). En paquitena SYCP3 marca los ELs sinapsados de los autosomas y sólo colocaliza con CyA en los EAs del bivalente XY (Fig. 63 B). En diplotena temprana CyA continúa marcando los EAs del bivalente XY y el cuerpo denso del nucleolo, y además comienza a detectarse como señales redondeadas en los extremos de los ELs desinapsados marcados con SYCP3 (Fig. 63 C, D). En diplotena tardía se observa una total colocalización de CyA y SYCP3 a lo largo de los ELs de los bivalentes autosómicos y los EAs del bivalente XY, en las señales en los extremos de los EA/ELs e incluso en los engrosamientos a lo largo de los ELs desinapsados (Fig. 63 E, F) que ya hemos descrito en detalle previamente tanto para SYCP3 (Fig. 1 O-S) como para RAD21 (Fig. 14 B-D, Fig. 15 D, E y Fig. 16 B). En diacinesis, CyA y SYCP3 marcan unas intensas señales localizadas en los extremos de los ELs desinapsados y una tenue señal parcheada a lo largo de los mismos, así como de forma cada vez más intensa los engrosamientos de los ELs (Fig. 63 G, H). En prometafase-I, CyA y SYCP3 colocalizan totalmente en los aglomerados citoplasmáticos que aparecen dispersos en el citoplasma. Sin embargo, mientras que en esta etapa se puede seguir observando un tenue marcaje de SYCP3 en los ELs desinapsados, ésta señal es ya prácticamente indetectable con CyA (Fig. 63 I, J). Tanto en diplotena tardía como en intercinesis y prometafase-I, CyA continúa marcando el cuerpo denso del nucleolo, el cual siempre se localiza muy cercano al bivalente XY (cabezas de flecha en Fig. 63 E-J). En metafase-I, CyA y SYCP3 colocalizan totalmente en unas señales centroméricas en forma de “T” y en el dominio intercromatídico del bivalente XY, así como en los aglomerados citoplasmáticos (Fig. 63 K-N). En esta etapa puede apreciarse con SYCP3 un marcaje parcheado a lo largo del dominio intercromatídico de los autosomas, el cual no se



detecta con CyA (Fig. 63 K-N). En anafase-I SYCP3 sigue marcando una señal en forma de “T” en los centrómeros, sin embargo no se detecta señal de CyA en los mismos (Fig. 63 O, P). En esta etapa CyA marca dos pequeños puntos en cada polo celular que presumiblemente se corresponden con las parejas de centriolos (flechas en Fig. 63 O). En telofase-I SYCP3 pasa a tener una señal en forma de barras cercanas a los cinetocoros hermanos, mientras que CyA se sigue detectando únicamente en los presuntos centriolos (Fig. 63 Q, R). En intercinesis persisten las barras de SYCP3 mientras que CyA suele aparecer como leves señales redondeadas que no se corresponden con los cinetocoros (Fig. 63 S, T). Además, en intercinesis volvemos a observar una intensa señal de CyA fuera del núcleo (Fig. 63 S, T) que recuerda a la observada en paquitena (Fig. 63 A, B), y que como hemos dicho podría corresponder presumiblemente con la región organizadora de los centriolos. No hemos encontrado ningún marcaje de CyA en ninguna de las etapas de la segunda división meiótica (imágenes no mostradas).

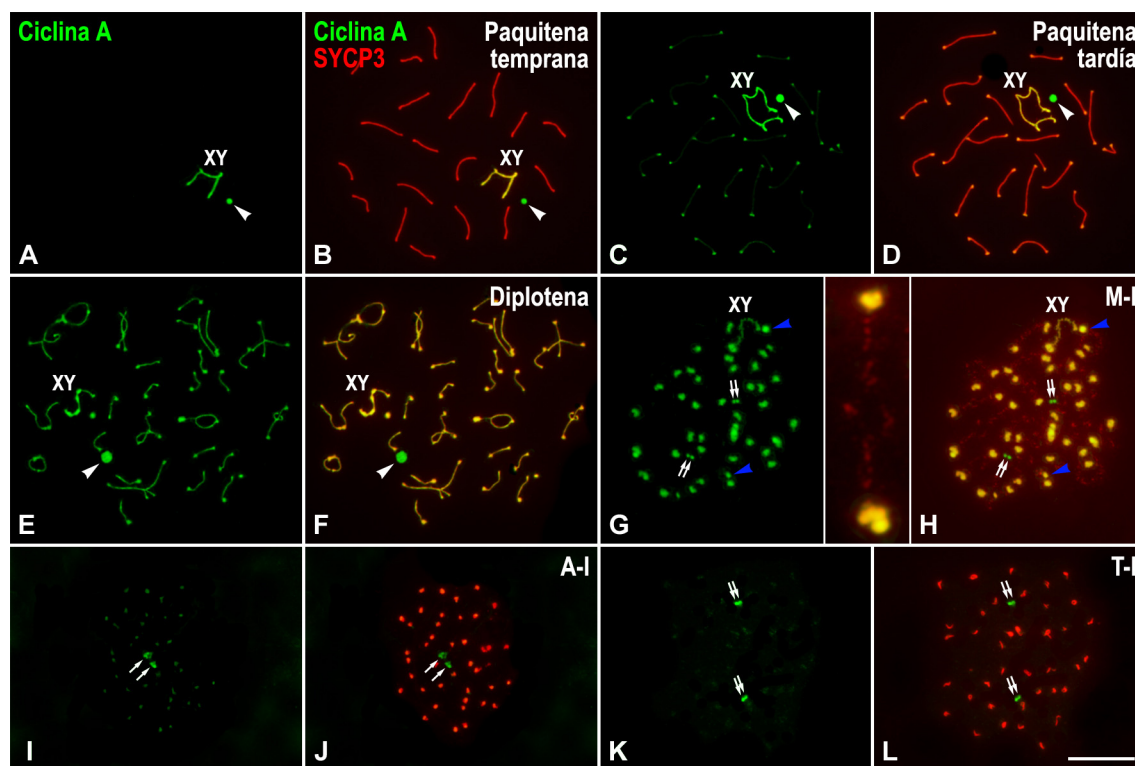
Para corroborar con otra técnica el patrón de distribución que habíamos observado para CyA en las preparaciones de aplastado, decidimos realizar la doble inmunodetección de CyA y SYCP3 en esparcidos de espermatocitos. Pudimos observar que el patrón de distribución de CyA en esparcido se corresponde con lo que habíamos observado previamente en aplastado con pequeñas diferencias. En las paquitenas tempranas en preparaciones de esparcido CyA marca los EAs del bivalente XY y el cuerpo denso del nucleolo, sin embargo, a diferencia de lo observado en aplastado, no se marca todo el volumen del cuerpo sexual (Fig. 64 A, B). En las paquitenas tardías se puede apreciar levemente un marcaje de CyA a lo largo de los ELs de los autosomas (Fig. 64 C) que no podía observarse en aplastado, y además se observa con claridad que las señales que veíamos en aplastado en los extremos de los ELs de las diplotenas tempranas (Fig. 63 C, D) se localizan tanto en los extremos centroméricos como en los teloméricos distales (Fig. 64 C, D). Gracias a las características de la técnica de esparcido podemos observar que en diplotena CyA marca los ELs de todos los autosomas y los EAs del bivalente XY (Fig. 64 E-F). En metafase-I observamos una total colocalización de CyA y SYCP3 en los centrómeros, mientras que solamente SYCP3 se detecta en el dominio intercromatídico (Fig. 64 G, H). Curiosamente, y a diferencia de lo que observábamos en aplastado, con la técnica de esparcido sí se detectan dos pequeñas señales punteadas en metafase-I que se corresponden con las

parejas de centriolos (flechas en Fig. 64 G, H). En anafase-I y telofase-I, mientras que en aplastado no se detectaba ningún marcaje de CyA en los centrómeros (Fig. 63 O-R), con la técnica de esparcido sí podemos apreciar una levísima señal de CyA en los centrómeros tanto en anafase-I (Fig. 64 I, J) como en telofase-I (Fig. 64 K, L). En esparcido, también se detectan las parejas de centriolos tanto en anafase-I (Fig. 64 I, J) como en telofase-I (Fig. 64 K, L). Con todos estos resultados comprobamos que la distribución de CyA se mantiene tanto en aplastado como en esparcido, pero que por las características de la técnica, el esparcido nos permite en éste caso observar la distribución de la proteína con más precisión.



**Figura 63.** Doble inmunolocalización de Ciclina A (verde) y SYCP3 (rojo) en espermatocitos aplastados en diferentes etapas meióticas. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, B) Paquitena. Las flechas blancas indican el marcaje de Ciclina A en una región fuera del núcleo en la que se diferencian con más intensidad dos pequeños puntos, cuyo marcaje podría presumiblemente corresponder a la región

donde se sitúan los centriolos. Ciclina A marca también intensamente todo el volumen del cuerpo sexual (XY) y los EAs del bivalente sexual, así como una pequeña e intensa señal redondeada localizada al lado del XY que se corresponde con el cuerpo denso del nucleolo (cabeza de flecha blanca). (C-F) Diplotena. Ciclina A comienza a detectarse también en los centrómeros y a lo largo de los ELs desinapsados. (G, H) Diacinesis. Ciclina A y SYCP3 comienzan a detectarse sobre engrosamientos a lo largo de los ELS desinapsados. (I, J) Prometáfase-I. Las señales de Ciclina A y SYCP3 en el dominio intercromatídico son muy leves, mientras que se observan intensas señales en los centrómeros. Aparecen también acumulaciones citoplasmáticas en las que colocan ambas proteínas. (K-N) Metafase-I. Ciclina A colocaliza totalmente con SYCP3 en el dominio intercromatídico del bivalente sexual (XY) y en unas intensas señales con forma de "T" en los centrómeros. Las cabezas de flecha azules en K y L indican un aglomerado citoplasmático en el que colocan Ciclina A y SYCP3. (O-R) Anafase-I y telofase-I. Las flechas blancas en O y Q indican el marcaje de Ciclina A en los polos celulares. (S, T) Intercinesis. Ciclina A marca pequeñas señales en el núcleo que no colocan con las barras de SYCP3 y una intensa señal fuera del núcleo que podría corresponder con la región organizadora de los centriolos. Las cabezas de flecha blancas indican el cuerpo denso del nucleolo marcado con Ciclina A en paquitena (A, B), diplotena (C-F), diacinesis (G, H) y prometáfase-I (I-J). Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en T representa 5  $\mu$ m.



**Figura 64.** Doble inmunolocalización de Ciclina A (Ciclina A) (verde) y SYCP3 (rojo) en espermatocitos esparcidos en diferentes etapas meióticas. (A-D) Paquitena. Ciclina A marca los EAs del bivalente sexual (XY), y únicamente en paquitena tardía se observa un marcaje sobre los extremos de los CSs de los autosomas y un marcaje casi inapreciable sobre los CSs. Las cabezas de flecha blancas indican el cuerpo denso del nucleolo. (E-F) Diplotena. Ciclina A y SYCP3 colocalizan en los ELs sinapsados y desinapsados. Las cabezas de flecha blancas indican el cuerpo denso del nucleolo. (G-H) Metafase-I. Ciclina A y SYCP3 colocalizan en unas intensas señales centroméricas, mientras que únicamente SYCP3 marca el dominio intercromatídico. Las cabezas de flecha azules indican aglomerados citoplasmáticos en los que colocan los marcajes de Ciclina A y de SYCP3. (I-J) Anafase-I. Las señales centroméricas de SYCP3 persisten mientras que las señales de Ciclina A son casi inapreciables. (K-L) Telofase-I. SYCP3 cambia su conformación a barras mientras que las señales de Ciclina A son casi inexistentes. Las parejas de flechas blancas en G-L indican parejas de puntos marcados con Ciclina A que podrían corresponder con las parejas de centriolos en los polos celulares. La barra de medida en L representa 5  $\mu$ m.

## **8. Estudio de un modelo de ratón con univalentes en metafase-I: análisis del ratón mutante para *rad51c***

La proteína RAD51C es miembro de la familia RecA/RAD51 y juega un importante papel en el procesamiento de los intermediarios de Holliday cuyo modo de acción se centra en la reparación de dobles roturas de DNA a través de recombinación homóloga (Liu y col., 2004; Kawabata y col., 2005). El estudio del mutante para la proteína RAD51C resulta muy interesante puesto que se ha descrito que la frecuencia de aparición de univalente en metafase-I es muy elevada en machos de ratón (Kuznetsov y col., 2007). Por ello, decidimos solicitar al Dr. Sharan el envío de ejemplares mutantes para poder estudiar si las cohesinas aparecen o no en los univalentes en metafase-I. Generosamente nos fueron enviados 4 individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> (alelo nulo/alelo hipomórfico). En este punto hay que clarificar que los individuos mutantes homocigotos *Rad51c*<sup>-/-</sup> son letales, por lo tanto se generaron individuos con niveles mínimos de proteína lo suficientemente abundante como para la supervivencia, pero que no alcanzan la fertilidad, a los que se llamó *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> (Kuznetsov y col., 2007).

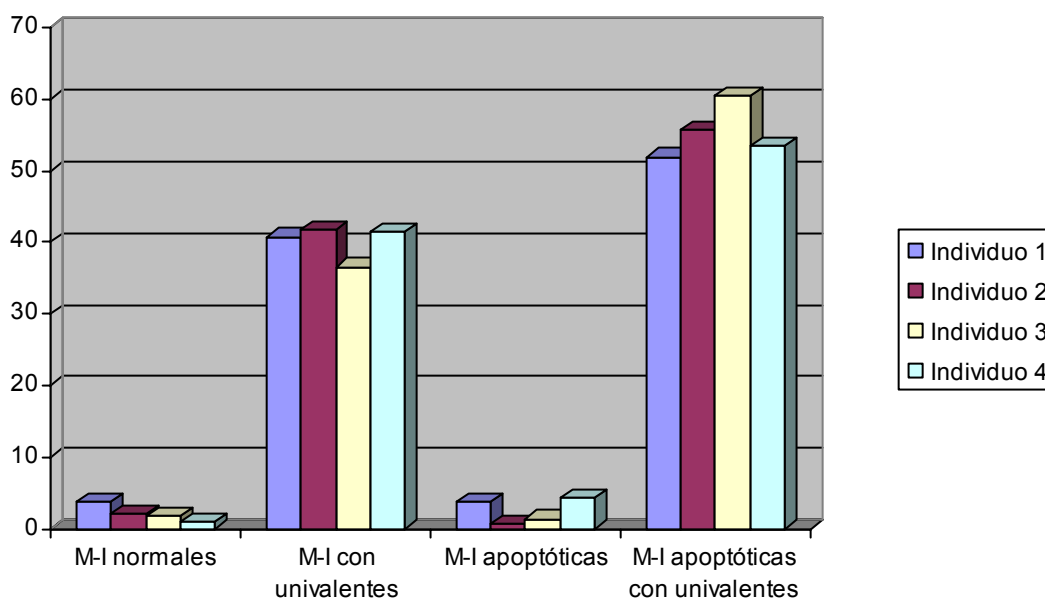
### **8.1. Análisis de la meiosis de mutantes *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>**

Tras recibir cuatro individuos macho de ratón *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> se procedió en primer lugar a comprobar que, tal y como se había publicado (Kuznetsov y col., 2007), el peso de los testículos de estos individuos está muy reducido:

- Individuo KO/neo 1: Testículo 1: 23,4 mg, Testículo 2: sin túbulos seminíferos
- Individuo KO/neo 2: Testículo 1: 25,5 mg, Testículo 2: 23,9 mg
- Individuo KO/neo 3: Testículo 1: 30 mg, Testículo 2: 24 mg
- Individuo KO/neo 4: Testículo 1: 20 mg , Testículo 2: 17 mg

Dado que se había descrito previamente que la frecuencia de aparición de univalentes en metafases-I en los ratones *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> es muy alta, también comprobamos el número de metafases-I con univalentes que aparecen en estos individuos, así como el número de metafases-I apoptóticas (Tabla y Gráfico 12).

Metafases -I en <i>Rad51c</i> <sup>ko/neo</sup>	Tipos	Individuo 1	Individuo 2	Individuo 3	Individuo 4
	Normal	4 (3.70%)	3 (1.98%)	4 (1.70%)	1 (0.86%)
	Con univalentes	44 (40.74%)	63 (41.72%)	86 (36.59%)	48 (41.37%)
	Apoptótica	4 (3.70%)	1 (0.66%)	3 (1.27%)	5 (4.31%)
	Apoptótica con univalentes	56 (51.85%)	84 (55.62%)	142 (60.42%)	62 (53.44%)
	TOTAL	108 (100%)	151 (100%)	235 (100%)	116 (100%)



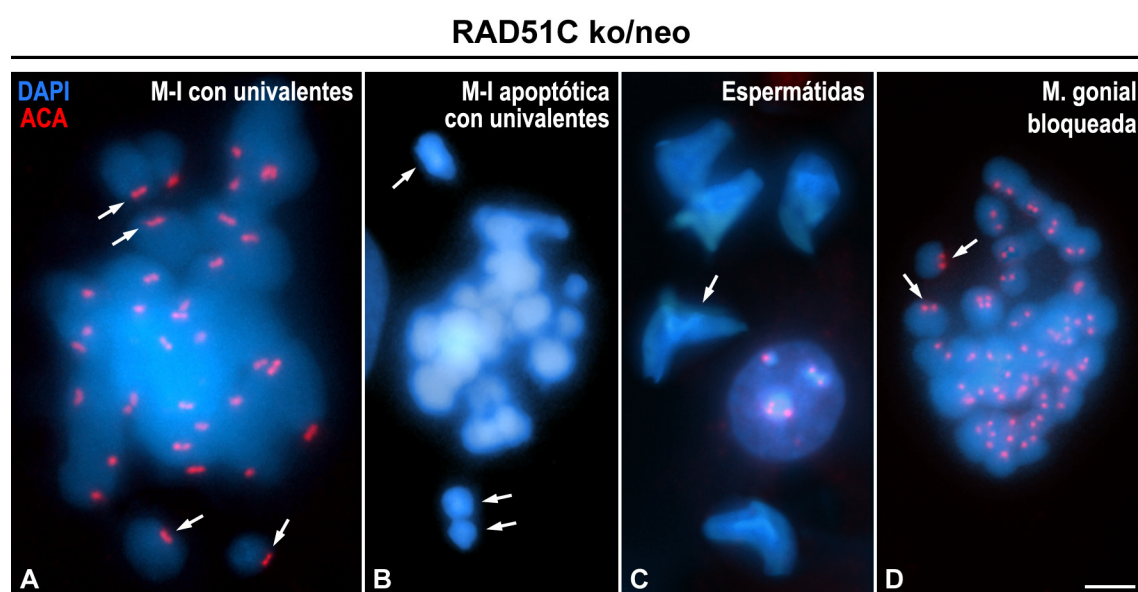
**Tabla y Gráfico 12.** Porcentajes de tipos de metafases-I en individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>.

Como podemos observar en el Gráfico y Tabla 12, los porcentajes son concordantes para los cuatro individuos, y podemos encontrar fundamentalmente dos tipos de metafases-I. En todos los individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> encontramos prácticamente la mitad de las metafases-I con univalentes (Fig. 65 A), y la otra mitad son metafases-I apoptóticas, con la característica reducción de tamaño e hipercondensación de la cromatina, en las cuales se pueden apreciar univalentes fuera de placa (Fig. 65 B). En los univalentes presentes en las metafases-I podemos distinguir claramente las señales de los dos cinetocoros hermanos asociados (Fig. 65 A). Se ha demostrado que la

presencia de univalentes en las placas de metafase-I induce la entrada en apoptosis (Eaker y col., 2001), por lo que suponemos que la mayoría de ese casi 50% de metafases-I con univalentes desembocarán en el otro 50% de metafases-I apoptóticas con univalentes, lo que concuerda con el hecho de que no hayamos encontrado prácticamente telofases-I ni espermatocitos en segunda división meiótica. Las escasas espermátidas elongadas que hemos encontrado suelen tener morfologías aberrantes (Fig. 65 C), e incluso hemos encontrado cromocentros fragmentados en alguna espermátida redonda (Fig. 65 C). Todos estos datos pueden explicar la infertilidad de estos individuos.

Por otro lado, hemos encontrado un alto porcentaje de espermatocitos en profase-I apoptóticos, lo cual es lógico teniendo en cuenta que la función principal de RAD51C consiste en reparar el DNA a través de recombinación homóloga (Kawabata y col., 2005).

Además, también hemos encontrado multitud de metafases espermatogoniales bloqueadas, en las cuales los cinetocoros hermanos están mucho más separados de lo normal, y la cromatina está hipercondensada dando como resultado cromosomas más cortos y redondeados (Fig. 65 D y comparar con Fig. 67 E y F). Aunque en un principio dudamos de si estas células eran metafases-I con todo univalentes, pudimos demostrar, como explicaremos a continuación, que son células espermatogoniales. También pueden encontrarse en estos individuos divisiones mitóticas aparentemente normales.

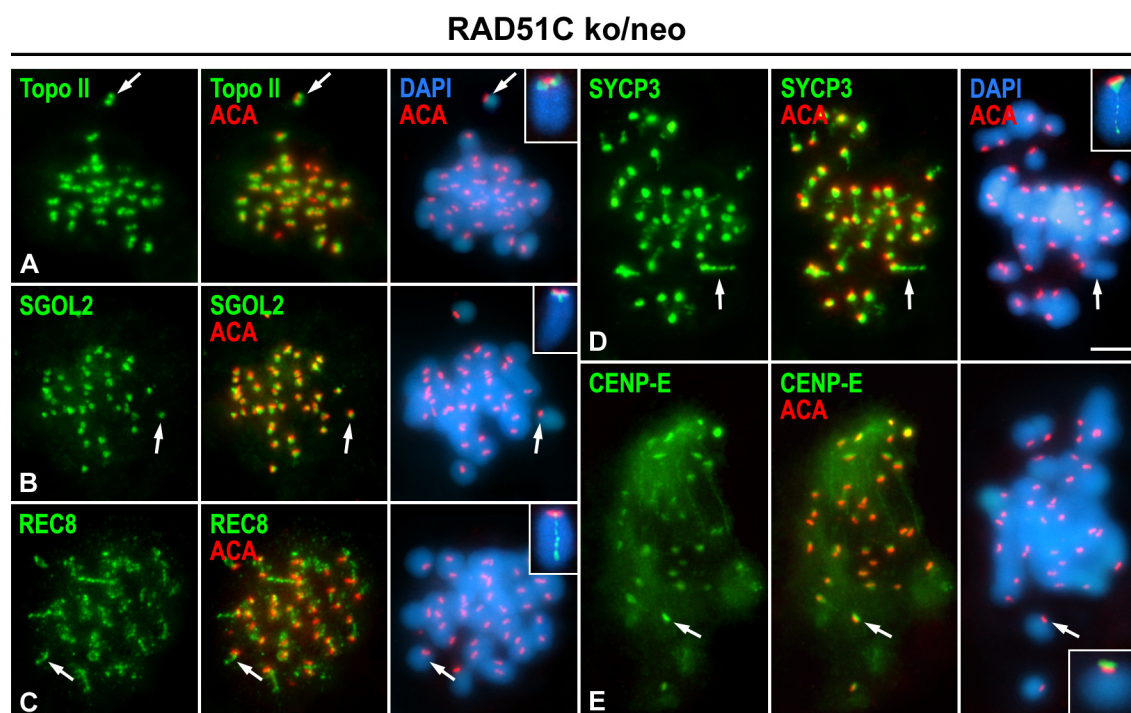




◀ **Figura 65.** Inmunolocalización de los cinetocoros (ACA, rojo) y contratinción con DAPI (azul) en espermatocitos aplastados en metafase-I, espermatidas y metafase espermatogonial en el mutante *Rad51c*<sup>KO/neo</sup>. (A) Metafase-I con univalentes. Las flechas indican algunos de los univalentes fuera de placa. (B) Metafase-I apoptótica con univalentes. Las flechas indican univalentes fuera de placa. (C) Espermatidas. La flecha indica una espermatida anómala. (D) Metafase espermatogonial bloqueada. Las flechas indican los cinetocoros hermanos ligeramente separados. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 3  $\mu$ m.

## 8.2. Análisis de diferentes proteínas en mutantes *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>

Para comprobar si las proteínas Topo II, SGOL2, la cohesina REC8, la proteína SYCP3 del CS, y CENP-E tenían una distribución en metafase-I semejante en el mutante *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> frente a los individuos silvestres (WT), realizamos dobles inmunodetecciones de dichas proteínas junto con los cinetocoros (Fig. 66). En las metafases-I observamos en primer lugar que Topo II aparece como dos señales redondeadas bajo los cinetocoros hermanos tanto en los bivalentes como en los univalentes (Fig. 66 A). SGOL2 aparece como una señal en forma de “T” en el dominio interno de los centrómeros tanto en bivalentes como en univalentes (Fig. 66 B). REC8 marca el dominio intercromatídico como una señal parcheada y el dominio centromérico como una pequeña señal bajo los cinetocoros hermanos asociados tanto en bivalentes como en univalentes (Fig. 66 C). SYCP3 marca una estructura centromérica en forma de “T” y se localiza a modo de parches en el dominio intercromatídico en bivalentes y univalentes (Fig. 66 D). Estas cuatro últimas proteínas tienen el mismo patrón de localización que lo que se observa en individuos WT. Por último, observamos que CENP-E aparece como señales que son más grandes y brillantes en los univalentes que están fuera de placa que en los bivalentes alineados (Fig. 66 E). Esta distribución es concordante con el hecho de que en individuos normales CENP-E aparece de forma más intensa sobre los cinetocoros de bivalentes no alineados y una señal mucho más tenue en los cinetocoros de los bivalentes en placa (Parra y col., 2003).



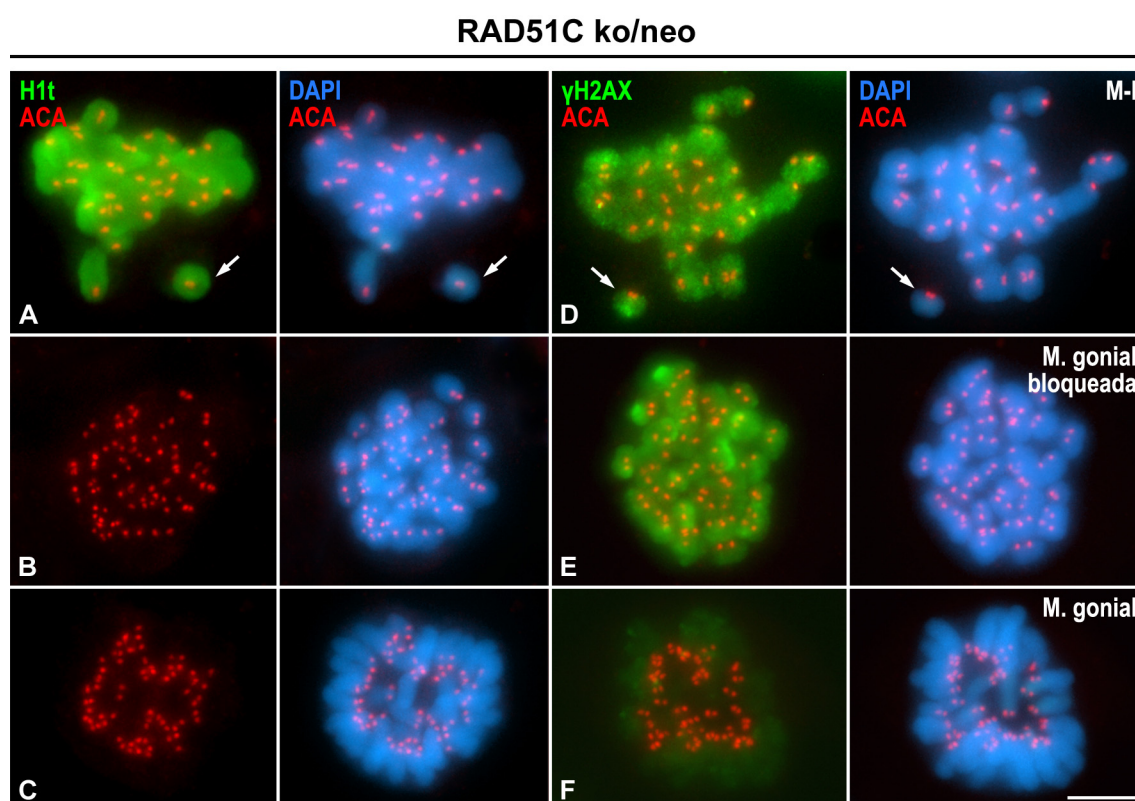
**Figura 66.** Dobles inmunolocalizaciones de los cinetocoros (ACA, rojo) junto con Topo II (verde) (A), SGOL2 (verde) (B), REC8 (verde) (C), SYCP3 (verde) (D) y CENP-E (verde) (E) en espermatocitos aplastados en metafase-I del mutante *Rad51c<sup>KO/neo</sup>*. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). Las flechas indican univalentes fuera de placa. Puede observarse que la señal para todas las proteínas analizadas es la misma tanto en bivalentes como en univalentes, a excepción de CENP-E cuya señal es particularmente intensa en los centrómeros de los univalentes que se encuentran fuera de placa. Los detalles muestran a mayor aumento diferentes univalentes seleccionados con los respectivos marcajes de las proteínas analizadas. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en D representa 5  $\mu$ m.

Para demostrar que las células que consideramos metafases mitóticas espermatogoniales bloqueadas son realmente mitosis y no metafases-II, realizamos la doble inmunodetección de la histona H1t y los cinetocoros. H1t es una histona específica de meiosis que marca la totalidad de la cromatina en todos los espermatocitos a partir de paquitena media (Cobb y col., 1999a). Pudimos ver que efectivamente en las metafases-I se tiñe totalmente la cromatina con H1t (Fig. 67 A). En cambio, ni en las metafases goniales normales (Fig. 67 C) ni en las bloqueadas (Fig. 67 B) presentes en los mutantes pudimos detectar marcaje de la histona H1t.

Por último, quisimos comprobar si existen dobles roturas no reparadas en las metafases-I de los mutantes que presentaban univalentes y en las metafases mitóticas bloqueadas. Por ello, realizamos la detección de la histona  $\gamma$ H2AX, la cual es una forma de H2AX que está fosforilada en la serina 139 y que en mamíferos aparece marcando los lugares de rotura de doble hebra de DNA producidas durante la recombinación meiótica o la apoptosis (Rogakou y col., 1998; Rogakou y col., 2000; Mahadevaiah y



col., 2001). En primer lugar hay que comentar que en las metafases goniales de individuos normales nunca aparece marcaje de  $\gamma$ H2AX. Sin embargo, nosotros pudimos detectar que tanto en las metafases-I con univalentes (Fig. 67 D) como en las metafases mitóticas bloqueadas (Fig. 67 E) aparece marcaje de  $\gamma$ H2AX en toda la cromatina, resultado que demuestra que probablemente esas dobles roturas no reparadas son lo que provocarán que esas células entren en apoptosis.



**Figura 67.** Dobles inmunolocalizaciones de la histona H1t (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) (A-C), y de  $\gamma$ H2AX (verde) y los cinetocoros (ACA, rojo) en espermatocitos aplastados en metafase-I y metafase espermatogonial del mutante *Rad51C*<sup>ko/neo</sup>. La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). (A, D) Metafase-I. Se marca prácticamente la totalidad de la cromatina tanto con H1t como con  $\gamma$ H2AX. Las flechas indican dos univalentes fuera de placa. (B, E) Metafase espermatogonial bloqueada. No se detecta ningún marcaje de H1t mientras que se marca prácticamente la totalidad de la cromatina con  $\gamma$ H2AX. (C, F) Metafase espermatogonial. No se detecta ningún marcaje de H1t mientras que se observa una leve señal de  $\gamma$ H2AX. Todas las imágenes son proyecciones en el eje z de diferentes planos focales. La barra de medida en F representa 5  $\mu$ m.



---

***Discusión***





## DISCUSIÓN

En esta memoria de Tesis Doctoral se presentan los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia indirecta de la localización de las principales proteínas involucradas en la cohesión entre cromátidas hermanas a lo largo de las dos divisiones meióticas en machos de ratón: las proteínas pertenecientes al complejo de cohesina, la proteína protectora de la cohesión centromérica SGOL2 y la proteína decatenadora de DNA Topo II $\alpha$ . Estos estudios han permitido el análisis de las diferentes distribuciones que adoptan dichas proteínas a lo largo de la meiosis, así como inferir las posibles funciones que puedan estar desempeñando cada una de ellas en las diferentes etapas. Para discutir los resultados obtenidos con más claridad, dividiremos la discusión en cinco apartados. El primer apartado abarca los resultados obtenidos para la dinámica del complejo de cohesina durante las dos divisiones meióticas. El segundo apartado engloba los estudios realizados acerca de los procesos de regulación de la cohesión centromérica mediada por SGOL2. El tercer apartado se centra en la función de la Topo II y las proteínas relacionadas. El cuarto apartado se centra en el estudio del comportamiento de los univalentes en metafase-I mediante el análisis del modelo de ratón mutante para la proteína RAD51C. Y por último, el quinto apartado pretende exponer un modelo de segregación cromosómica durante la meiosis de machos de ratón.

### **1. El complejo de cohesina. Distribución y funciones en espermatoцитos de ratón**

#### **1.1. Primera división meiótica**

Durante la profase de la primera división meiótica los procesos de apareamiento, sinapsis y recombinación permiten la biorientación de los cromosomas homólogos recombinados en metafase-I, y la liberación diferencial de la cohesividad braquial en anafase-I permitirá la segregación de los cromosomas homólogos a polos opuestos y la generación de células hijas con n cromosomas con carga 2C.

### 1.1.1. El complejo sinaptonémico y el eje de cohesinas

En esta memoria se presentan los resultados obtenidos relevantes a la distribución de la proteína SYCP3 del CS, la cual es la mejor herramienta para el estudio de la sinapsis en meiosis. Los complejos de cohesina se anclan a la cromatina durante los procesos de replicación de la interfase (Miyazaki y Orr-Weaver, 1994) y se localizan a lo largo de un eje proteico denominado eje de cohesina, el cual subyace a los EAs/ELs del CS (Yuan y col., 1998; Pelttari y col., 2001; Valdeolmillos y col., 2007). Por lo tanto, la distribución que se espera encontrar para las cohesinas, al menos durante la profase de la primera división meiótica, ha de ser muy similar a la de las proteínas de los ELs del CS, como es el caso de SYCP3.

Durante la profase-I, observamos que todas las cohesinas analizadas tienen en rasgos generales la misma distribución, que además es igual a la encontrada para la proteína SYCP3, y que se localiza a lo largo de los EAs y ELs del CS. Además, hay que apuntar que comprobando lo previamente propuesto por Parra y col. (2004), hemos observado que RAD21 presenta una distribución idéntica a la que presenta SYCP3 a lo largo de los EAs y ELs durante la profase-I. El hecho de que sus distribuciones colocalicen a lo largo de toda la meiosis afianza la idea de que el CS está ensamblado sobre el eje de cohesinas (Valdeolmillos y col., 2007), hecho que se demostró con la generación del modelo *Knockout* de ratón para SYCP3 en el cual no se altera la formación del eje de cohesinas pero sí la formación del CS (Yuan y col., 2002). Otro resultado que apoya la idea de que el eje de cohesinas subyace al CS defiende que REC8 y STAG3 son detectadas en ovocitos fetales humanos antes que la propia SYCP3 (Prieto y col., 2004).

Hemos detectado mediante inmunofluorescencia indirecta que las cohesinas analizadas y SYCP3 aparecen en leptotena como finas hebras onduladas que se corresponden con los EAs no sinapsados. Además, únicamente SYCP3 y RAD21 aparecen también en las regiones nucleolares. Ya desde este momento se comienza a observar que SYCP3 y RAD21 tienen una distribución exacta, puesto que ambas se acumulan en el nucleolo, sin embargo, ni REC8, SMC3 o STAG3 aparecen acumulados en dichas regiones durante la profase-I. Además, SYCP3 y RAD21 marcan también unos engrosamientos en los extremos cromosómicos que se denomina placas de asociación, y que sin embargo no se observan con el resto de cohesinas estudiadas (Esquema 11).

Por otro lado hemos observado que mientras que REC8 se localiza en los EAs desde leptotena temprana, RAD21 y SYCP3 comienzan detectándose en los nucleolos en leptotena temprana y sólo se detectan como finas hebras que se corresponden con los EAs a partir de leptotena tardía. Estos resultados confirman que la detección de REC8 en la profase de ratón es previa a RAD21 y SYCP3, y concuerdan con lo propuesto previamente en rata (Eijpe y col., 2003).

### **1.1.2. Disociación parcial de las cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase-I**

A través de los estudios realizados hemos podido observar que de acuerdo con estudios previos realizados en mamíferos para SYCP3 (Parra y col., 2004), SMC1 $\beta$  (Revenkova y col., 2001), SMC3 (Eijpe y col., 2003), STAG3 (Prieto y col., 2001; Parra y col., 2004; Prieto y col., 2004) y REC8 (Eijpe y col., 2003), dichas proteínas se van liberando progresivamente de los ELs desinapsados desde diacinesis temprana hasta prometafase-I. En esta línea también se ha demostrado que durante la profase-I de *S. cerevisiae* existe una pérdida de complejos de cohesina que contienen Rec8 mediada por fosforilación (Kateneva y col., 2005). Es importante destacar que aunque estos resultados ya se han descrito con anterioridad, en ningún caso se han mostrado con detalle las imágenes citológicas que demuestren la liberación parcial de cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase-I en ratón.

Con los resultados obtenidos podemos separar dos grupos de proteínas en función a su patrón de liberación parcial de los brazos cromosómicos en el periodo entre diacinesis temprana y prometafase-I (Esquema 11).

Por un lado hemos observado que RAD21 y SYCP3 marcan engrosamientos a lo largo de los ELs desinapsados a partir de diacinesis temprana, a la vez que se produce un aumento de la fluorescencia en el nucleoplasma, donde se comienzan a detectar aglomerados que son detectados con ambas proteínas. La aparición de estos engrosamientos se aprecia tanto en los bivalentes autosómicos como en el sexual. El número y tamaño de los aglomerados de RAD21/SYCP3 en el nucleoplasma aumenta enormemente durante la diacinesis tardía, así como su intensidad de fluorescencia. Por el contrario, la intensidad de fluorescencia en el citoplasma desciende durante la prometafase-I, mientras los aglomerados de RAD21/SYCP3 son aún detectables, y el marcaje que persiste en el dominio intercromatídico en bivalentes en metafase-I es



significativamente menor que el encontrado en los ELs en diplotena tardía. Los engrosamientos y los aglomerados de RAD21/SYCP3 no han sido observados por otros autores puesto que todos los estudios realizados por otros grupos de investigación se suelen realizar mediante la técnica del esparcido de espermatozoides. Esta técnica conlleva un choque hipotónico y el empleo del detergente Photo-Flo, lo que produce una desorganización de la EN y la consiguiente solubilización del nucleoplasma (Moeny y col., 1987; Peters y col., 1997). Estos procesos provocan que las poblaciones de RAD21 y SYCP3 nucleoplasmáticas y los propios engrosamientos de los ELs en estas preparaciones sean eliminadas en el transcurso de la técnica. Proponemos que tal vez estos aglomerados nucleoplasmáticos de RAD21/SYCP3 provienen de los engrosamientos en los ELs que se ven en diacinesis temprana, y que son fruto de la liberación parcial de ambas proteínas del eje de cohesinas a medida que progresa la condensación cromosómica. Sería muy interesante para investigaciones futuras el poder analizar estos aglomerados de RAD21/SYCP3 con microscopía electrónica para poder discernir si se trata de policomplejos u otro tipo de estructura proteica. El hecho de que la localización de SYCP3 y RAD21 sea exacta (Parra y col., 2004) apoya el que puedan unirse para formar juntas estos aglomerados. Por ello, ha sido también muy interesante la realización de coinmuoprecipitaciones que verifiquen si la colocalización de RAD21 y SYCP3 se sustenta en una unión molecular estable entre ambas proteínas. Sorprendentemente, tras realizar la doble IP de SYCP3 y RAD21, hemos comprobado que aparentemente ambas proteínas no forman un complejo estable en extractos de testículo de ratón.

Por otro lado hemos observado que las cohesinas REC8, SMC3 y STAG3 marcan los ELs desinapsados a partir de diacinesis temprana de forma cada vez más parcheada (Esquema 11). Sin embargo, nunca hemos observado un aumento en la intensidad de la fluorescencia nucleoplasmática, ni tampoco engrosamientos a lo largo de los ELs ni aglomerados nucleoplasmáticos con ninguna de estas tres cohesinas.

Una pregunta clave es por qué razón se produce esta liberación parcial de cohesinas y de SYCP3 de los brazos cromosómicos entre diacinesis y prometafase-I. Hay varias respuestas posibles. En un principio se sugirió que en mitosis, la disociación parcial de cohesinas de los brazos cromosómicos independiente de Separasa podría ser un prerrequisito para permitir que sucedan los últimos pasos de la condensación cromosómica hasta metafase (Losada y Hirano, 2001; Nasmyth, 2002). Sin embargo, se

ha visto que el bloqueo de esta liberación parcial de cohesinas no causa defectos en la condensación, sino que únicamente impide la resolución de las cromátidas hermanas (Losada y col., 2002; Sumara y col., 2002). En segundo lugar, se ha propuesto también en mitosis que la vía de liberación parcial de cohesinas de los brazos en profase mediante fosforilación de SA2 se basa en procesos de regulación de la expresión génica. De este modo, ya que la Separasa se une preferencialmente a los complejos de cohesina unidos a cromatina (Waizenegger y col., 2000; Hornig y Uhlmann, 2004), al liberar parte de los complejos de los brazos en profase no se destruirían todos ellos en la transición a anafase, sino únicamente los que permanecen asociados al centrómero y los pocos que queden en brazos, quedando así intactos los liberados previamente en la profase. Estos complejos estarían pues disponibles para futuras rondas de mitosis. En vertebrados, a diferencia de lo que ocurre en levaduras, los complejos de cohesina mitóticos comienzan a unirse a la cromatina ya en telofase tardía (Losada y col., 1998; Darwiche y col., 1999; Sumara y col., 2000), y es por ello que ha de haber complejos de cohesina disponibles en tiempos muy cortos. Sin embargo, nosotros no creemos que esta explicación pueda aplicarse a la meiosis, ya que en éste caso, las cohesinas liberadas en profase-I que quedarían “disponibles” en el citoplasma, no van a necesitarse para futuras rondas de división dado que la meiosis es un modelo de división unidireccional. Una tercera hipótesis propone que el hecho de “relajar” la cohesión entre cromátidas hermanas previamente a la anafase podría ser un seguro para que la segregación pueda darse con más garantías (Peters y col., 2008). Por último, una cuarta hipótesis se centra en que la disminución de la cohesión entre brazos aumente el espacio entre las cromátidas para dar cabida a los futuros procesos de decatenación mediados por la Topo II (Peters y col., 2008).

Nosotros proponemos que la eliminación parcial de cohesinas de los ELs entre diacinesis temprana y prometafase-I podría ser necesaria para permitir la posterior resolución braquial de cromátidas hermanas en metafase-I/anafase-I, dejando también abierta la posibilidad de que pueda ser para permitir la acción decatenadora de Topo II, y que en cierto modo, facilite además la condensación cromosómica.

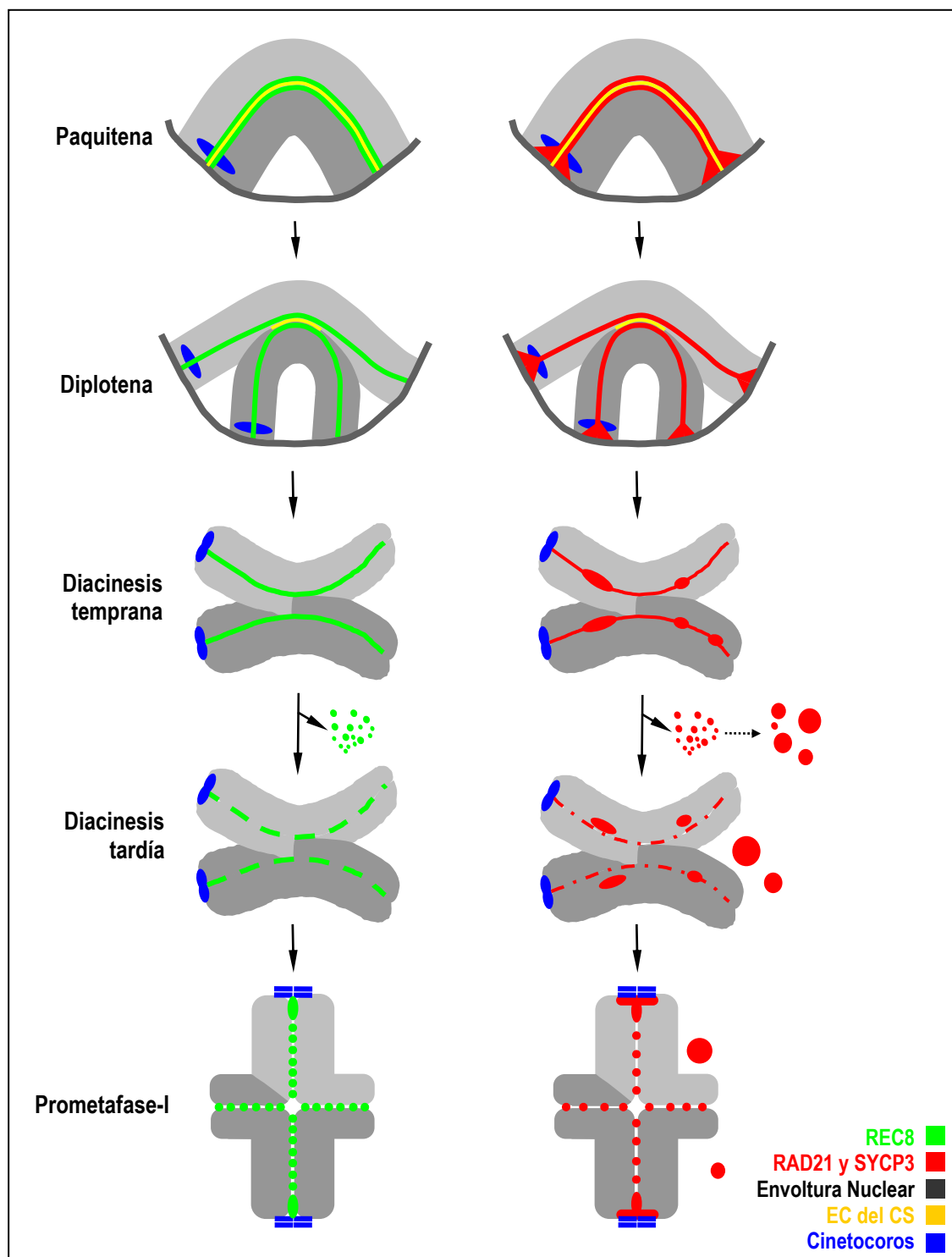
Pero queda sin resolver la cuestión de cuáles son los mediadores de la liberación parcial de cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase-I. Se ha demostrado en mitosis que la disociación parcial de cohesinas a nivel de brazos durante la profase no es dependiente de Separasa, sino que está mediada por fosforilación de la cohesina

SA2 por la quinasa PLK1 (Losada y col., 2002; Sumara y col., 2002; Uhlmann, 2003a; Hauf y col., 2005). Por este motivo hemos intentado inmunodetectar PLK1, sin embargo tras hacer varias pruebas con diferentes anticuerpos, solamente pudimos detectar con uno de ellos que PLK1 se localiza en los cinetocoros tanto en metafase-I como en metafase-II así como en los polos celulares (imágenes no mostradas). Con este patrón de localización no tenemos por el momento evidencias suficientes para inferir un modelo que explique cómo PLK1 puede estar regulando la disociación parcial de cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase-I meiótica, por lo que serán necesarios más estudios para poder esclarecer estos mecanismos.

Por otro lado es muy interesante discutir el hecho de que en mitosis se ha demostrado que la quinasa pasajera del dominio centromérico interno Aurora B (Losada y col., 2002; Giménez-Abián y col., 2004), es imprescindible para que se produzca la liberación de cohesinas de brazos durante la profase. Sin embargo, nosotros no encontramos evidencias suficientes para implicar a Aurora-B en la disociación parcial de cohesinas durante la profase-I pues sólo la detectamos en el centrómero, y nunca a lo largo de los EAs/ELs del CS (Parra y col., 2003). También se ha publicado que los cofactores del complejo de cohesina PDS5A, WAPL y Sororina participan en la liberación de cohesinas de los brazos cromosómicos durante la profase mitótica (Sumara y col., 2000; Rankin, 2005; Gandhi y col., 2006; Kueng y col., 2006; Watrin y Peters, 2006; Wendt y col., 2008; Shintomi y Hirano, 2009). Estas proteínas deben de estar mediando de algún modo en un mecanismo independiente de Separasa que permita la liberación de los anillos de cohesina, pues la Separasa no se activará hasta la activación del APC en metafase. Nosotros hemos visto que en meiosis, PDS5B y WAPL aparecen localizadas marcando los EAs/ELs del CS. Proponemos por tanto que, ya que ambas proteínas se localizan sobre los EAs/ELs durante la profase, al igual que lo hacen las cohesinas, quizás una de ellas o incluso las dos podrían estar participando en la liberación parcial de cohesinas entre brazos también en meiosis. En relación con ésta hipótesis es interesante comentar que en células mitóticas humanas se pierde prematura y rápidamente la cohesión entre cromátidas hermanas tanto a nivel de brazos como en el centrómero tras la sobreexpresión de WAPL. Contrariamente, tras la depleción de WAPL mediante RNAi aparecen gran cantidad de cohesinas entre los brazos cromosómicos en prometafase como reflejo de la inactivación de la liberación parcial de cohesinas de brazos durante la profase (Gandhi y col., 2006; Kueng y col.,

2006). Si bien se desconoce cuál es el mecanismo molecular que rige el proceso, se sabe que en mitosis WAPL interacciona con SA2 y RAD21 (Gandhi y col., 2006), y PDS5A y PDS5B lo hacen con SA1 y SA2 respectivamente (Sumara y col., 2000; Losada y Hirano, 2005), por lo que suponemos que podría ser que en meiosis ambos cofactores estén involucrados en este proceso mediante interacción con las ortólogas STAG3 y REC8/RAD21. Desafortunadamente, no hemos podido detectar al cofactor de cohesión Sororina con ninguno de los anticuerpos disponibles, pero no descartamos que pueda también estar involucrada en este proceso.

Por último, hay que dejar abierta también la posibilidad de que la Ciclina A (CyA) también pueda ser partícipe de esta liberación parcial de cohesinas de brazos durante la profase-I. Esta especulación surge del hecho de que nosotros hemos detectado CyA marcando los ELs a partir de paquitena tardía, y entre diplotena tardía y metafase-I siguiendo un marcaje idéntico a SYCP3 tanto en los engrosamientos en los ELs como en los aglomerados citoplasmáticos y en el marcaje de los centrómeros. Con los resultados que hemos obtenido para la distribución de CyA en la meiosis de ratón y conociendo que los ratones mutantes para CyA son estériles puesto que su meiosis se bloquea en diplotena (Nickerson y col., 2007), proponemos que puede CyA esté también regulando la pérdida de cohesión parcial de los brazos a partir de diplotena, de modo que tendría una influencia directa en los procesos de segregación cromosómica durante la meiosis-I. El modo de actuación podría ser que CyA activa a la quinasa correspondiente (aún no conocida), que fosforilaría a RAD21 para que se produzca su liberación parcial de los brazos cromosómicos durante la profase-I. Esos complejos liberados que podrían estar acoplados a su vez a la quinasa correspondiente y a la CyA se visualizarían citológicamente como engrosamientos a lo largo de los ELs y tras su liberación como aglomerados citoplasmáticos que aparecen marcados en diacinesis y metafase-I tanto con RAD21 como con SYCP3 y con CyA.



**Esquema 11.** Liberación parcial de la proteína SYCP3 del CS y de las cohesinas REC8 y RAD21 de los brazos cromosómicos durante la diacinesis de la meiosis de ratón. Este esquema también representa la acumulación de SYCP3 y RAD21 en las regiones centroméricas en la transición diacinesis tardía/prometáfase-I.

### 1.1.3. Acumulación de RAD21 en las regiones centroméricas

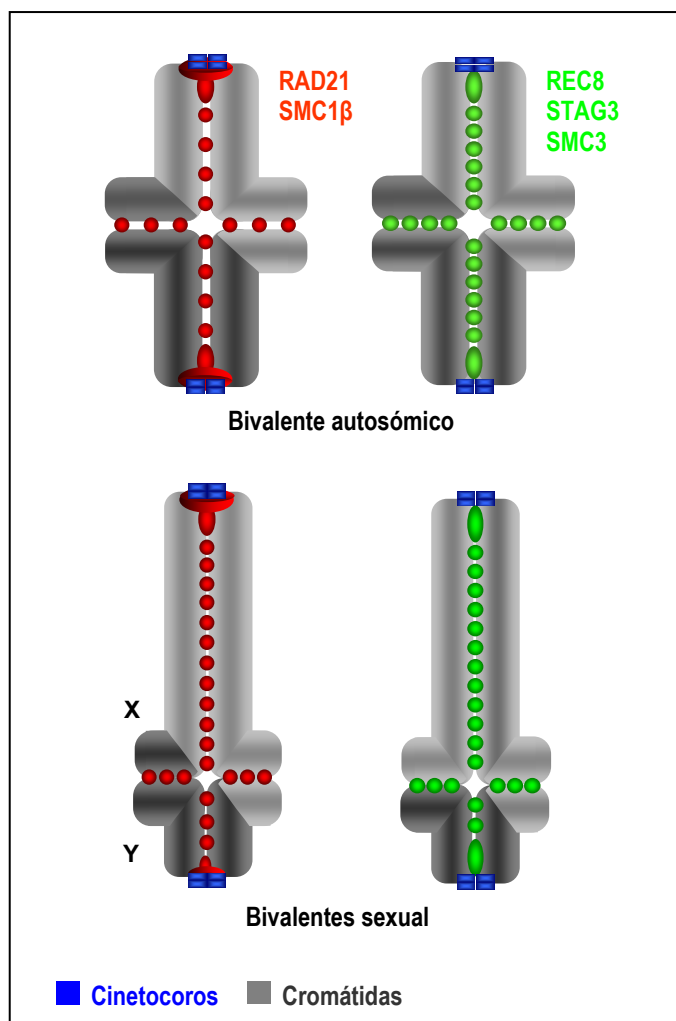
Nuestros resultados demuestran que en diacinesis no existe ninguna acumulación de las cohesinas estudiadas en las regiones centroméricas. Sin embargo, en la transición diacinesis/prometáfase-I se produce una acumulación de RAD21 en los centrómeros, comenzando a aparecer una estructura con forma de “T”. Esta acumulación no se observa con REC8 ni tampoco con STAG3 o SMC3 (Esquema 11). Pero sí hemos detectado que SYCP3 también comienza a acumularse en los centrómeros en prometáfase-I (Esquema 11), al igual que ocurre con CyA. Es muy significativo recordar que tanto RAD21 como SYCP3 y CyA experimentan una exacta disociación parcial de los brazos cromosómicos durante la diacinesis que se refleja en la aparición de engrosamientos en los ELs, que posteriormente se sueltan de los mismos convirtiéndose en aglomerados citoplasmáticos (Esquema 11). No podemos descartar que parte de estos aglomerados citoplasmáticos puedan más tarde reincorporarse a la cromatina en las regiones centroméricas constituyendo así la acumulación que observamos en los centrómeros de estas tres proteínas durante la prometáfase-I.

La acumulación de RAD21, SYCP3 y CyA en los centrómeros en la transición diacinesis tardía/prometáfase-I coincide con la desorganización de la EN y consecuentemente con el momento en que los telómeros se sueltan de la misma. Además, en este mismo periodo se ha descrito que se produce la internalización de los telómeros desde una posición externa a los cinetocoros, mientras que las regiones teloméricas están anclados a la EN durante la profase, a una posición por debajo de las señales cinetocóricas en prometáfase-I (Viera y col., 2003). No podemos excluir la idea de que la internalización de los telómeros, la rotura de la EN, la liberación parcial de RAD21, SYCP3 y CyA de los ELs y la acumulación de las mismas en las regiones centroméricas sean procesos relacionados e interdependientes entre sí, pues todos ellos se producen al unísono durante la transición diacinesis/prometáfase-I.

#### 1.1.4. Distribución de las cohesinas en bivalentes en metafase-I

Nuestros resultados demuestran que la cohesina RAD21 aparece enriquecida principalmente en el dominio centromérico interno, colocalizando con la proteína SYCP3 de los ELs del CS, y de manera menos intensa en el dominio intercromatídico. Sin embargo, las cohesinas REC8, SMC3 y STAG3 aparecen mayoritariamente en los brazos cromosómicos, y sólo parcialmente en la región interna del centrómero ocupando una pequeña región de la misma (Esquema 12).

Tal y como hemos comentado previamente, también intentamos realizar la inmunodetección de las cohesinas SMC1 $\beta$ , SA1 y SA2 con diferentes anticuerpos (Tabla 2 de Material y Métodos), pero desafortunadamente nunca obtuvimos una reactividad positiva para ninguno de los anticuerpos empleados.



**Esquema 12.** Distribución de las cohesinas en bivalentes en metafase-I.

#### 1.1.4.1. Cohesión intercinetocórica y centromérica

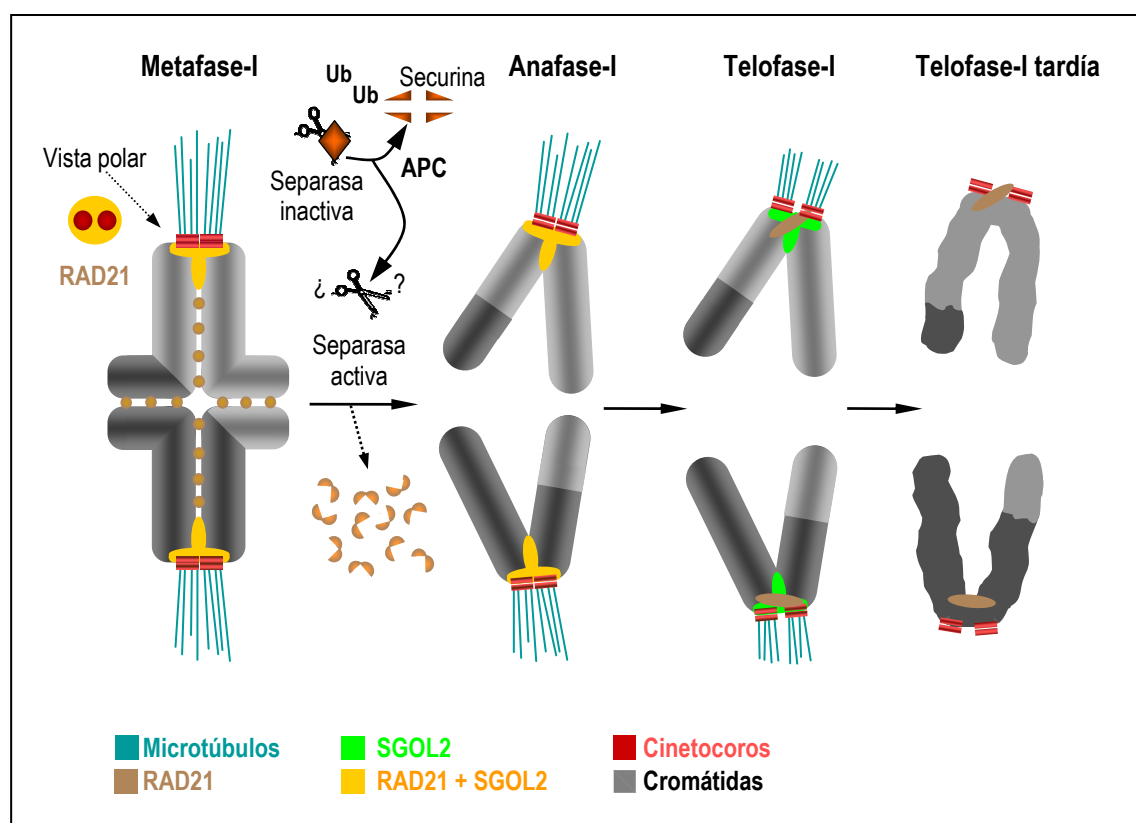
Según diversas publicaciones sobre experimentos realizados sobre espermátocitos de rata y ratón, las cohesinas RAD21, REC8, SMC3 y SMC1 $\beta$  han sido detectadas en el centrómero durante la primera división meiótica y hasta la metafase-II (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Xu y col., 2004).

Basándonos en nuestros resultados, podemos distinguir dos grupos de cohesinas dependiendo de la distribución que presentan en los centrómeros en metafase-I.

En un primer grupo tenemos a RAD21, que al igual que SYCP3, aparece claramente localizada en el dominio centromérico interno en metafase-I visualizándose como una estructura tridimensional en forma de “doble cornete”. Sugerimos que esta estructura tiene como misión mantener la asociación entre los cinetocoros hermanos, es decir la cohesión intercinetocórica, hasta la telofase-I para permitir la orientación sintética de los cinetocoros hermanos (Parra y col., 2004) (Esquemas 12, 13 y 15). El hecho de implicar a RAD21 en la cohesión intercinetocórica durante la primera división meiótica se basa en que el cambio conformacional que experimenta RAD21 en telofase-I, de “doble cornete” a barra, coincide con la pérdida de la cohesión intercinetocórica que se expresa citológicamente como la separación de los cinetocoros hermanos que habían estado íntimamente asociados hasta ese momento (Esquema 13). Es importante recalcar en este punto la diferencia entre cohesión intercinetocórica, la cual se mantiene hasta la separación de la unidad funcional de los cinetocoros hermanos en telofase-I, y la cohesión centromérica, que en cambio es aquella que mantiene unidas las cromátidas hermanas por la región del centrómero hasta la anafase-II. En este apartado tenemos también que comentar que hemos intentado inmunodetectar a la cohesina SMC1 $\beta$  con diferentes anticuerpos, pero nunca hemos obtenido resultados positivos. Sin embargo, otros autores han descrito en espermátocitos de rata (Revenkova y col., 2001) y ovocitos de ratón (Kouznetsova y col., 2005) una localización de SMC1 $\beta$  exacta a la que nosotros vemos para RAD21 en bivalentes en metafase-I, aunque no han podido establecer aún cuál es la estructura tridimensional en los centrómeros. Para futuros puntos en la discusión, tomaremos como referencia estos trabajos para comentar las posibles implicaciones que pueda tener la distribución de SMC1 $\beta$ , que asumiremos que por tanto es la misma que RAD21. Es muy interesante también resaltar que hemos encontrado la misma distribución tridimensional en forma de “doble cornete” para las proteínas SYCP3 y SYCP2 (Parra y col., 2004), la Shugoshina SGOL2 (Gómez y col.,

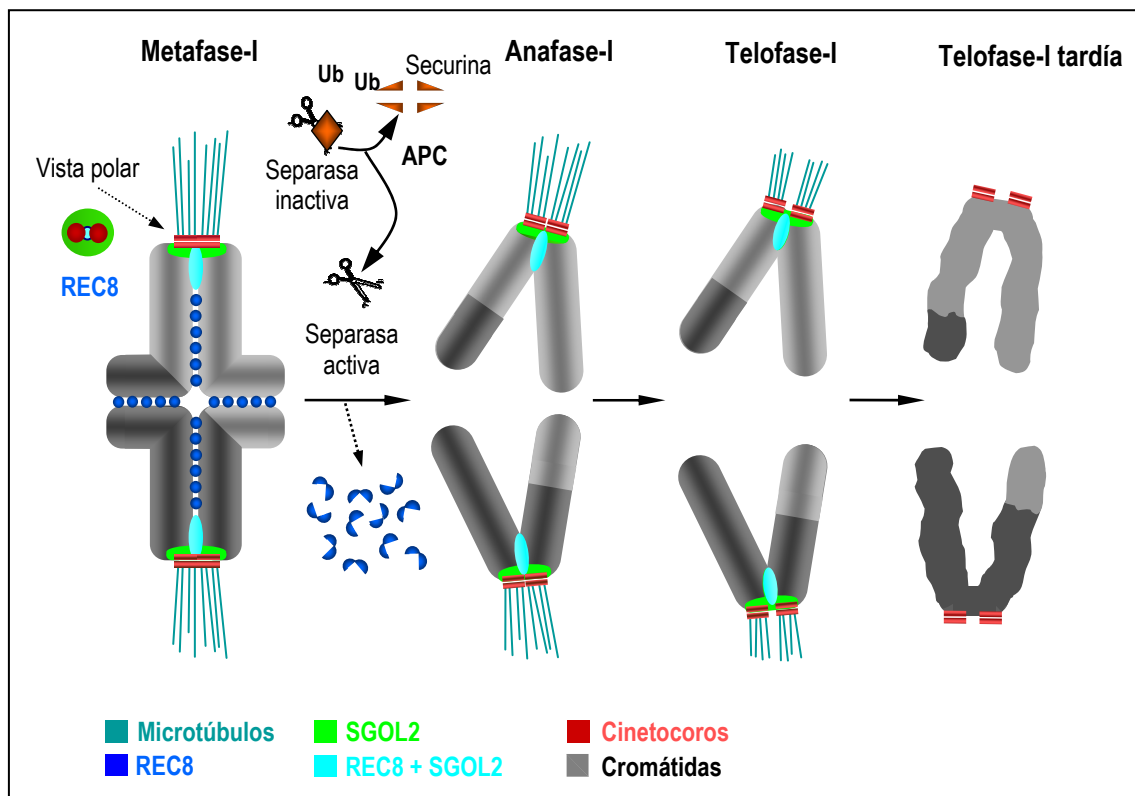


2007) y la Ciclina A apareciendo las cuatro con una localización con forma de “T” en visión lateral y a modo de dobles anillos en visión polar idéntica a la RAD21. También hemos podido detectar con esta misma distribución en los centrómeros de metafase-I a los cofactores del complejo de cohesina PDS5B y WAPL, a las proteínas pasajeras del centrómero INCENP y Aurora B (Parra y col., 2003) y la quinesina asociada al centrómero MCAK (Parra y col., 2006), que sin embargo es la única que aparece como un anillo simple en visión polar. Por ello, el hecho de que aparezca la misma estructura con todas estas proteínas, apunta a que el dominio tridimensional en “doble cornete” del centrómero interno se confirma como una importante estructura en los cromosomas de ratón en metafase-I, pues acoge a una nutrida serie de proteínas con funciones diversas que engloban la cohesión intercinetocórica, la regulación de la misma y los procesos de control de la entrada en anafase-I que aseguren la orientación sintética de los cinetocoros.



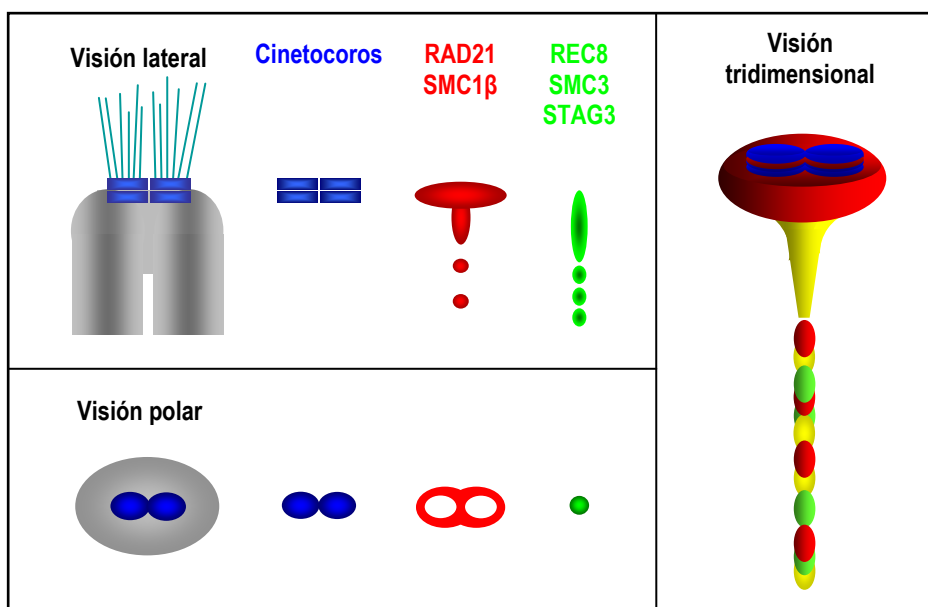
**Esquema 13.** Distribución de RAD21 y SGOL2 en cromosomas condensados de la primera división meiótica de ratón.

En un segundo grupo de cohesinas que aparecen en el dominio centromérico interno en metafase-I tenemos a REC8, SMC3 y STAG3. Estas cohesinas aparecen en una subregión del dominio interno del centrómero que colocaliza parcialmente con RAD21, aunque nunca colocalizan con las señales cinetocóricas, y que correspondería tridimensionalmente al “mango del doble cornete”, (Esquemas 12, 14 y 15). Dado que las señales centroméricas de REC8 se pierden en telofase-I tardía no podemos descartar que en ratón los complejos de cohesina con REC8 también estén implicados en mantener la cohesión intercinetocórica, al igual que se ha propuesto en levaduras (Klein y col., 1999; Watanabe y Nurse, 1999), en *C. elegans* (Pasierbek y col., 2001) y en *A. thaliana* (Chelysheva y col., 2005). La mayoría de los autores proponen además que REC8 participa también en la cohesión centromérica hasta la metafase-II (Buonomo y col., 2000; Lee y col., 2003). Ya que REC8 es la única cohesina que nosotros hemos detectado en metafase-II, apoyamos la idea de que pueda ser participe también de la cohesión centromérica hasta la metafase-II en la meiosis de ratón. No obstante, queda por esclarecer con qué otras subunidades puede estar REC8 formando complejo en metafase-II.



**Esquema 14.** Distribución de REC8 y SGOL2 en cromosomas condensados de la primera división meiótica de ratón.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos para todas las cohesinas analizadas podemos proponer un modelo estructural del centrómero en cromosomas de ratón (Esquema 15). Este modelo se basa en la existencia de una estructura tridimensional a modo de “doble cornete” que abraza a ambos cinetocoros hermanos, permitiendo así que actúen como una unidad funcional durante la metafase-I con el fin de que puedan orientar sintéticamente, es decir, ambos cinetocoros hermanos orientando a un mismo polo. Esta estructura en “doble cornete” se desorganizará con la pérdida de la cohesión intercinetocórica en telofase-I, momento en el cual los grupos de cromosomas homólogos ya han alcanzado los polos y los cinetocoros hermanos individualizados ya no tienen que comportarse como una unidad funcional. Este “doble cornete” estaría formado por RAD21 y presumiblemente también por SMC1 $\beta$  (Kouznetsova y col., 2005). Además, la parte vertical de esta estructura, lo que sería el “mango del cornete” en visión lateral, es un subdominio especial, ya que es la única región en donde coinciden todas las cohesinas analizadas, bien sean de las mayoritariamente localizadas en centrómero (RAD21 y SMC1 $\beta$ ) o bien las predominantes a nivel de brazos (REC8, SMC3 y STAG3). Esta región se observa como un punto en vista polar que además se encuentra en el centro del doble anillo de RAD21 (Esquemas 14 y 15).



**Esquema 15.** Vista lateral, frontal y tridimensional de las cohesinas en los centrómeros de ratón en metafase-I

Queda por tanto claro con nuestros resultados, que las cohesinas REC8 y RAD21 coexisten durante la meiosis de ratón. Esta idea ha sido punto de importantes controversias y debates entre los diferentes autores. Estas opiniones contradictorias divergen fundamentalmente en apoyar la idea de que REC8 reemplaza a RAD21 en meiosis, propuesto en algunos trabajos de *S. cerevisiae* (Klein y col., 1999) y de rata y ratón (Nasmyth, 2001; Lee y col., 2002; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Watanabe, 2004), o bien en defender que ambas proteínas coexisten en *S. pombe* (Watanabe y Nurse, 1999; Yokobayashi y col., 2003) y ratón (Prieto y col., 2002; Parra y col., 2004). Curiosamente existen también otros trabajos publicados con posterioridad en los que se defiende la idea de la coexistencia de ambas cohesinas en levaduras de gemación (Kateneva y col., 2005). En esta memoria de Tesis Doctoral se ha demostrado que ambas proteínas coexisten, al menos en la meiosis de machos de ratón, y se ha intentado mostrar detalladamente su patrón relativo de distribución. En concreto es muy interesante destacar que, como hemos comentado, ambas proteínas coexisten en la parte vertical de la estructura tridimensional de “doble cornete”, y por ello, discutiremos en apartados posteriores como puede inferir este hecho en la posible existencia de múltiples complejos de cohesina diferentes. Por tanto, es presumible que al menos dos tipos diferentes de complejo de cohesina, bien con RAD21 o bien con REC8, podrían mantener la cohesión intercinetocórica hasta la telofase-I.

Por último, es importante discutir en el apartado referente al dominio centromérico, la evolución del patrón de distribución de las señales de las cohesinas detectadas en metafase-I en las ulteriores anafase-I y telofase-I. Tras la pérdida de la cohesión braquial en anafase-I, las señales centroméricas de RAD21 (Parra y col., 2004; Xu y col., 2004; Gómez y col., 2007), REC8 (Lee y col., 2002; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Gómez y col., 2007), SMC3 (Eijpe y col., 2003), SMC1 $\beta$  (Eijpe y col., 2003) y STAG3 (Prieto y col., 2001) persisten en los centrómeros, aunque con patrones de localización muy diferentes. Además, el hecho de que la mayoría de los autores utilice la técnica de esparcido hace que la identificación de las telofases-I, y sobre todo de las intercinesis, sea cuanto menos complicada. Nosotros hemos detectado con la técnica de aplastado, la cual mantiene el volumen celular y la estructura tridimensional original de las estructuras proteicas (Suja y col., 1999), que RAD21 persiste en los centrómeros de telofase-I como pequeñas barras entre los cinetocoros hermanos o ligeramente separadas de los mismos (Esquema 13), las cuales siguen observándose en

intercinesis aunque en menor cantidad. Curiosamente, SYCP3 sigue este mismo patrón en anafase-I, telofase-I y también en intercinesis. Sin embargo, tras la liberación de la cohesión braquial en anafase-I, REC8 persiste en los centrómeros con una pequeña señal en forma de coma bajo los cinetocoros hermanos. Estas pequeñas comas van difuminándose poco a poco en la telofase-I tardía, hasta llegar a desaparecer (Esquema 14). Este mismo patrón se observa con STAG3, pero debido a la poca calidad de las imágenes tomadas hemos decidido no mostrar las mismas. Por el contrario, hasta el momento no hemos podido detectar ninguna señal de SMC3 ni en anafase-I ni en intercinesis con ninguno de los anticuerpos de los que hemos podido disponer. A nuestro entender es de suponer que sí debe de existir cierto marcaje de SMC3 en anafase-I para que esta cohesina pueda formar complejo con las señales de las cohesinas RAD21 y REC8 que encontramos en esta etapa, pero que por razones desconocidas, que muy probablemente se deban a la eficiencia de los anticuerpos, no hemos podido detectar todavía. En intercinesis temprana no aparece ningún marcaje de REC8, pero en intercinesis más avanzadas comienza a reaparecer un ligero punteado. Como hemos demostrado, las diferentes cohesinas analizadas se pierden de forma diferencial por lo que cabría preguntarse si son todas estas diferentes pérdidas en telofase-I dependientes de una acción selectiva de la Separasa, como ocurre con la pérdida de cohesión braquial en anafase-I, o son por el contrario dependientes de fosforilación como la liberación parcial durante la profase. En base a nuestros resultados proponemos que presumiblemente los mecanismos que favorecen la pérdida de una u otra cohesina, o son distintos, o de ser los mismos ha de existir un mecanismo regulador muy preciso que controle que las diferentes cohesinas se liberen en el momento adecuado.

#### **1.1.4.2. Cohesión braquial**

El dominio intercromatídico se ha definido en meiosis como la superficie de contacto entre los brazos de las cromátidas hermanas en los bivalentes en metafase-I (Suja y col., 1999).

Las cohesinas que nosotros hemos detectado en el dominio intercromatídico mediante inmunofluorescencia indirecta sobre espermátocitos de ratón son RAD21, REC8, SMC3 y STAG3. Estas proteínas están presentes en los EAs y ELs del CS durante la profase-I. Hemos encontrado que entre diacinesis temprana y prometáfase-I, todas estas cohesinas son parcialmente eliminadas de los ELs, aunque persiste cierta

cantidad de estas cohesinas en el dominio intercromatídico de los bivalentes en metafase-I para asegurar el mantenimiento de la cohesión braquial hasta la transición metafase-I/anafase-I. Ahora bien, las cohesinas RAD21, REC8, STAG3 y SMC3 no muestran todas ellas la misma distribución en el dominio intercromatídico en los bivalentes autosómicos (Esquema 12). Así, mientras que las señales de REC8, SMC3 y STAG3 son intensas y muy próximas entre sí, las señales de RAD21 en los brazos son menos intensas y están más separadas entre ellas. Estas diferencias de marcaje se observan con claridad tras comparar las señales de REC8 y RAD21 en un mismo bivalente. Como comentaremos más adelante, estos resultados podrían indicar la existencia de al menos dos tipos de complejos de cohesina bien con REC8 o bien con RAD21 en el dominio intercromatídico de bivalentes autosómicos en metafase-I.

Es interesante discutir en qué medida las localizaciones a nivel de brazos de las cohesinas en el bivalente sexual son o no las mismas que se aprecian en los bivalentes autosómicos. Nuestros resultados sobre la distribución de RAD21, REC8, SMC3 y STAG3 en el dominio intercromatídico del bivalente sexual en metafase-I (Esquema 12) muestran que la cantidad de todas las cohesinas analizadas es mayor en el dominio intercromatídico del bivalente sexual, tanto en cuanto a intensidad como continuidad de parches, que la que aparece en los bivalentes autosómicos. Una posible explicación para esta diferencia es pensar que durante la transición diacinesis tardía/prometáfase-I existe una menor eliminación de complejos de cohesina de los brazos cromosómicos del bivalente sexual que la que ocurre en los autosomas. No obstante, durante la diacinesis se observan engrosamientos de RAD21 sobre los EAs no sinapsados de los cromosomas sexuales, similares a los observados sobre los ELs desinapsados en los autosomas. Este resultado parece indicar que también existe una pérdida parcial de complejos de cohesina a lo largo de los brazos de los cromosomas sexuales, pero pudiera ocurrir que la cantidad de complejos que se pierden es menor que la que ocurre en los brazos de los bivalentes autosómicos. Por otro lado, si tenemos en cuenta que el bivalente sexual ya aparece diferencialmente condensado respecto a los autosomas desde paquitena, está claro que los cromosomas sexuales deben de estar sujetos a una distinta regulación de su condensación, la cual podría también estar influyendo en la pérdida de complejos de cohesina en el dominio intercromatídico.

## 1.2. Segunda división meiótica

Durante la segunda división meiótica ha de mantenerse la cohesión centromérica hasta la transición metafase-II/anafase-II para asegurar el correcto reparto de cromátidas recombinadas a polos opuestos de la célula, lo que dará lugar a dos células hijas con n cromosomas y con carga C.

### 1.2.1. Presencia/ausencia de cohesinas en metafase-II

En base a nuestras observaciones, no hemos podido detectar ninguna de las cohesinas analizadas en los centrómeros de los cromosomas en metafase-II con el empleo de anticuerpos convencionales. Otros autores tampoco han detectado REC8 en metafase-II de maíz (Hamant y col., 2005), ni RAD21 en espermatoцитos de ratón (Parra y col., 2004) o en *S. cerevisiae* (Kateneva y col., 2005), ni tampoco la ortóloga SCC1 en *A. thaliana* (Cai y col., 2003; Chelysheva y col., 2005).

En contraposición a nuestros resultados, en otras investigaciones en las que se utilizaba la técnica de esparcido sobre espermatoцитos de ratón y rata sí se propuso que las cohesinas SMC1 $\beta$ , SMC3, RAD21 y REC8 estaban presentes en el centrómero en metafase-II y por tanto, como ocurre en levaduras y en *C. elegans*, asegurarían la cohesión centromérica (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Xu y col., 2004). Creemos que esta discrepancia se debe al tipo de metodología utilizada por dichos autores, puesto que los tratamientos de esparcido de espermatoцитos provocan que los cromosomas pierdan, entre otras, la interacción con los MTs del huso, de modo que los cromosomas aparecen dispersos, y en ocasiones muy descondensados, en el citoplasma de los espermatoцитos en división y es imposible mantener la ordenación original de los cromosomas. Este hecho hace que sea fácil el confundir un polo de anafase-I o telofase-I con una metafase-II, ya que en ambos casos tanto el número cromosómico como la disposición de las cromátidas hermanas, unidas únicamente a nivel del centrómero, es la misma. Por el contrario, nuestra técnica de aplastado mantiene tanto la condensación cromosómica como la interacción de los cromosomas con el huso durante las dos divisiones meióticas. Así, la técnica que nosotros utilizamos permite no sólo una correcta interpretación de la localización de las proteínas que analizamos, sino el identificar sin lugar a dudas la etapa meiótica que se está observando. Además, para corroborar la localización de la cohesina RAD21 en las etapas meióticas, hemos realizado triples inmunodetecciones de RAD21 junto con las

señales cinetocóricas y  $\alpha$ -Tubulina. Para asegurar aún más la identificación correcta de las fases hemos realizado medidas de las distancias entre los cinetocoros hermanos para diferenciar entre metafase espermatogonial, telofase-I y metafase-II (Tabla 4). Por último, hemos demostrado que la aparente ausencia de complejos de cohesina en metafase-II en ratón no se debe a fallos metodológicos o a la inaccesibilidad de los anticuerpos en espermatoцитos aplastados en esta fase, ya que sí que podemos detectar positivamente otras proteínas en los centrómeros de cromosomas en metafase-II tales como SGOL2, MCAK, Topo II y BubR1. Aún así, no podemos descartar que las cohesinas que se encuentran en los centrómeros de cromosomas en metafase-II estén en muy escasa cantidad, o que sufran modificaciones moleculares que imposibiliten su detección con anticuerpos de uso corriente.

Ya que existían discrepancias con otros autores, y que tras la prueba de multitud de anticuerpos nunca pudimos detectar ninguna de las cohesinas estudiadas en los cromosomas en metafase-II, decidimos que quizás para detectar cohesinas en metafase-II sería necesario el empleo de técnicas específicas de amplificación de señal. Gracias a la generosa cesión por parte del Dr. Kim Nasmyth de unos ratones macho portadores de un transgen REC8-*myc* (Kudo y col., 2006; Kudo y col., 2009), pudimos detectar gracias a esta metodología que REC8 aparece en metafase-II como una pequeña señal entre los cinetocoros hermanos. Al haber detectado únicamente REC8 en espermatoцитos en segunda división, no sabemos cómo podrían estar conformados los complejos de cohesina que regulen la cohesión centromérica hasta la anafase-II, pues no sabemos si serán también necesarias éstas técnicas especiales para poder detectar otras cohesinas en los cromosomas en metafase-II.

No obstante, no podemos descartar que existan otras subunidades no descritas del complejo de cohesina que sean responsables de la cohesión centromérica durante la segunda división meiótica, o bien que existan modificaciones moleculares de las subunidades conocidas en los cromosomas en metafase-II que no pueden ser reconocidas por los anticuerpos utilizados. Si existieran otras subunidades del complejo de cohesina no caracterizadas hasta ahora se apoyaría el hecho de que puedan existir más combinaciones de diferentes complejos de cohesina que estén más implicados en cohesión braquial en la primera división meiótica o en cohesión centromérica en la segunda división meiótica.



### 1.3. Existencia de diferentes complejos de cohesina

En los últimos años se han realizado diversos experimentos de inmunofluorescencia y de inmunoprecipitación que apuntan a que probablemente exista más de un tipo de complejo de cohesina durante la meiosis de ratón que difieren del complejo de cohesina canónico, compuesto por SMC1 $\beta$ , SMC3, REC8 y STAG3. El hecho de que las cohesinas REC8, RAD21, SMC3 y STAG3 presenten distintos patrones de pérdida de los ELs en diacinesis y de los centrómeros en telofase-I, junto con los diferentes patrones de localización en los bivalentes en metafase-I, nos hace pensar que existen diferentes combinaciones de subunidades que forman distintos complejos de cohesina, unos implicados principalmente en cohesión braquial y otros más implicados en cohesión centromérica. Aunque en publicaciones recientes ya se ha propuesto la hipótesis de los múltiples complejos tanto en *S. pombe* (Kitajima y col., 2003b) como en ovocitos de ratón (Revenkova y Jessberger, 2005), se desconoce todavía cómo estarían conformadas estas variantes del complejo de cohesina, cuál es su función específica, cómo se relacionarían entre sí, y cómo se regula su pérdida.

Son varios los resultados que apoyan la coexistencia de varios complejos de cohesina durante la meiosis de ratón. Uno de ellos es la coexistencia de las variantes mitóticas junto con las parálogas específicamente meióticas de algunas cohesinas, de tal modo que cada una de ellas pudiera formar parte de complejos diferentes. Así ocurre con SMC1 $\alpha$  y SMC1 $\beta$ , que coexisten en profase-I de ratón (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Revenkova y col., 2004), STAG2 (Prieto y col., 2002) y STAG3 (Prieto y col., 2001), y por último RAD21 y REC8 (Parra y col., 2004; Prieto y col., 2004; Xu y col., 2004). También se ha demostrado que Rad21 y Rec8 coexisten en *S. pombe* (Watanabe y Nurse, 1999) y las respectivas ortólogas Scc1 y REC8 también coexisten en *S. cerevisiae* (Kateneva y col., 2005). Además, en *S. pombe*, coexisten también dos ortólogas de Scc3/SA llamadas Psc3 y la específicamente meiótica Rec11, las cuales se unen con Rec8 formando complejos específicamente centroméricos o braquiales respectivamente (Kitajima y col., 2003b). En segundo lugar, SMC1 $\alpha$  coinmunoprecipita con REC8 y STAG3 en ensayos con espermatoцитos de ratón (Revenkova y col., 2004). Por otro lado REC8 también coinmunoprecipita con SMC1 $\beta$ , SMC3, SMC1 $\alpha$  y con STAG3, de modo que REC8 puede formar parte de al menos dos complejos diferentes, uno en el que intervendría SMC1 $\alpha$  y otro con SMC1 $\beta$ , ya que estas dos últimas no coprecipitan entre sí (Revenkova y Jessberger, 2005). Por último,

se ha publicado recientemente que únicamente el 30/40 % de las cohesinas se unen a WAPL en células HeLa (Gandhi y col., 2006), por lo que se podría especular que existen complejos de cohesina con y sin WAPL.

El conjunto de los datos aportados en esta memoria sustentan la existencia de múltiples complejos de cohesina desde tres perspectivas:

1. Hemos demostrado detalladamente la coexistencia de REC8 y RAD21. En primer lugar hemos observado que REC8 se detecta en los EAs previamente a RAD21. Además, el hecho de que ambas proteínas coexistan con el mismo patrón de localización desde leptotena tardía hasta diacinesis, pero que a partir de ese momento cambien, ya que el patrón de pérdida parcial de ambas a lo largo de los brazos cromosómicos es muy diferente (Esquema 11), sugiere que ambas formen parte de dos complejos diferentes desde el momento de su aparición.
2. Hemos detectado un diferente patrón de localización de las cohesinas analizadas en bivalentes en metafase-I existiendo dos patrones fundamentales: RAD21 se localiza principalmente en el centrómero y levemente a nivel de brazos, y en cambio REC8/SMC3/STAG3 aparecen intensamente a nivel braquial y en una pequeña región a nivel del centrómero. Además, también hemos mostrado que el patrón que adoptan dichas cohesinas es particularmente diferente en anafase-I/telofase-I e intercinesis.
3. El hecho de que únicamente hemos podido localizar REC8 en metafase-II sugiere que puede que sean otras cohesinas no analizadas hasta ahora las que forman complejo con REC8, o bien otro tipo de proteínas no pertenecientes al complejo, las que se encargarían de mantener la cohesión centromérica hasta la metafase-II.

En base a nuestros resultados de la dinámica de REC8, RAD21, SMC3 y STAG3, junto a los obtenidos por otros autores para las cohesinas SMC1 $\alpha$  (Revenkova y col., 2001) y SMC1 $\beta$  (Kouznetsova y col., 2005), proponemos la coexistencia de al menos seis diferentes tipos de complejos de cohesina formados por diferentes subunidades durante a meiosis de ratón (Esquema 16). El **complejo 1** contendría a las subunidades SMC1 $\alpha$ , SMC3, REC8 y STAG3, y el **complejo 2** sería aquél en el que en vez de REC8 encontramos RAD21. Pero ya que la subunidad SMC1 $\alpha$  se localiza en meiosis

únicamente hasta diplotena (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Revenkova y col., 2004), estos dos complejos sólo podrían estar presentes durante la profase-I hasta diplotena. El **complejo 3**, que hasta ahora se ha considerado el complejo “canónico” meiótico en mamíferos, estaría formado por SMC1 $\beta$ , SMC3, STAG3 y REC8. El posible **complejo 4** sería igual que el de tipo 3, con la salvedad de que en lugar de REC8 contendría RAD21. Estos complejos 3 y 4 estarían localizados en el dominio intercromatídico y en la región vertical de la estructura en forma de “T” que abraza a los cinetocoros hermanos. Ya que RAD21 (Parra y col., 2004) y SMC1 $\beta$  (Kouznetsova y col., 2005) son las únicas cohesinas que adoptan una estructura en forma de “T” en el dominio centromérico interno, podrían pertenecer a un posible **complejo 5** formado por un homodímero de SMC1 $\beta$ , RAD21 y muy posiblemente SA1/SA2, aunque la presencia de estas dos últimas cohesinas en dicho dominio no ha sido demostrada todavía. Este complejo 5 no podría contener STAG3, ni podría existir la variante con REC8, puesto que ninguna de estas dos últimas subunidades ha sido localizada en los dobles anillos de la “T” del dominio centromérico interno. Por último, nuestros datos sobre SMC3, en los que podemos observar una señal entre brazos mucho más intensa y continua de la que ven otros autores para SMC1 $\beta$  (Kouznetsova y col., 2005), podría apoyar la idea de la existencia de homodímeros de SMC3, aunque no podemos obviar que puede que estas diferencias se deban únicamente a la metodología utilizada. De este modo proponemos que podría también existir un posible **complejo 6** formado por homodímeros de SMC3, junto con STAG3 y REC8 que se encargaría de mantener la cohesión entre cromátidas hermanas únicamente a nivel braquial.

Por lo tanto todo indica a que RAD21 puede estar formando parte de complejos implicados en el mantenimiento de la cohesión a nivel de brazos (complejo 4), y otros más orientados a la cohesión a nivel del dominio centromérico interno (complejo 5). Esto se ve reforzado también con los datos que demuestran que en mitosis RAD21 se regula diferencialmente en brazos y en centrómeros en células HeLa (Waizenegger y col., 2000). Además, suponiendo que realmente existieran complejos con RAD21 y no REC8 queda la duda de averiguar si dichos complejos están protegidos también por las Shugoshinas a nivel centromérico durante la anafase-I, puesto que existen datos que apuntan a que SGOL1 no tiene efecto protector sobre RAD21 en la mitosis de *S. pombe* (Kitajima y col., 2004). De este modo, podría ser también que existan variantes de Shugoshina específicamente protectoras de RAD21. Nuestro grupo investigador ha

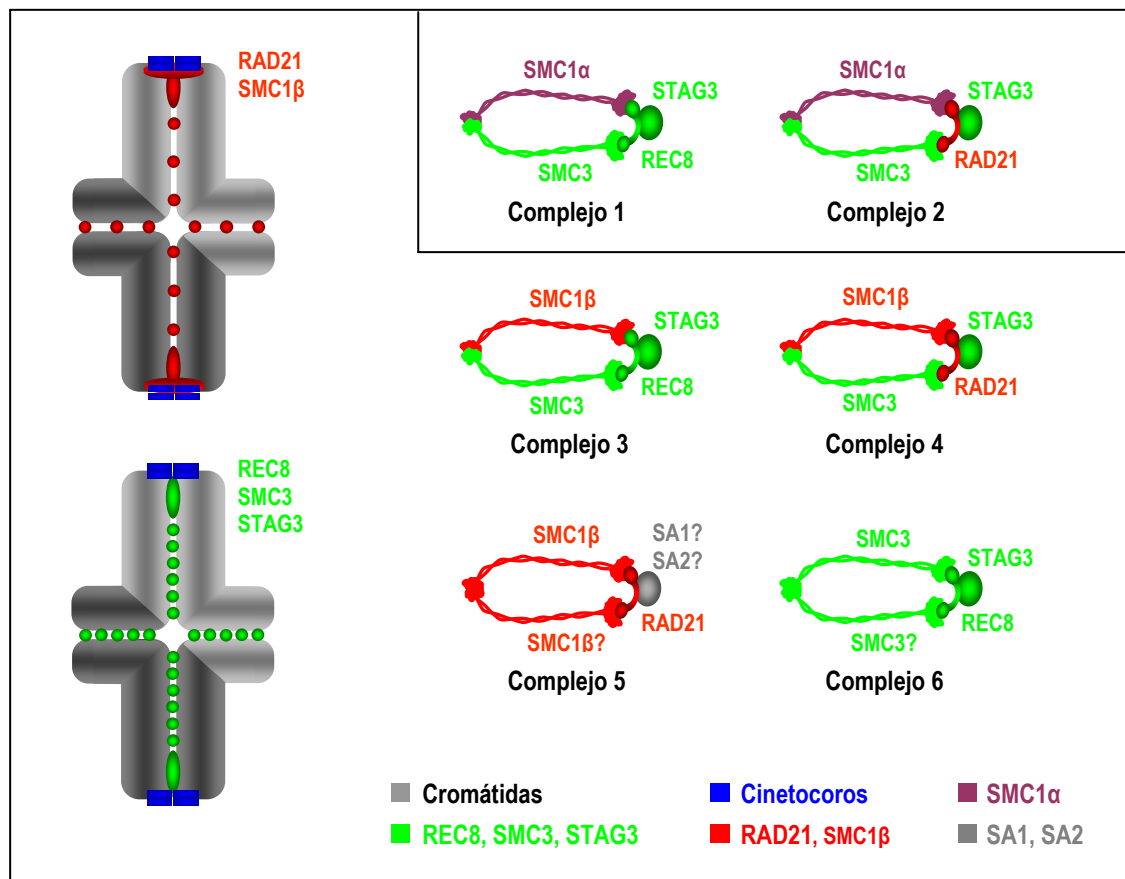
publicado recientemente los datos que en esta memoria se recogen, los cuales demuestran que RAD21 y SGOL2 tienen el mismo marcaje en centrómeros en metafase-I. Por lo tanto, podría ser SGOL2 la candidata perfecta que desempeñe el papel protector de los complejos de cohesina con RAD21. Por otro lado, también queda por discernir si la destrucción de los complejos con RAD21 a nivel braquial es también dependiente de Separasa durante la anafase-I, y a su vez si RAD21, al igual que ocurre con REC8 (Brar y col., 2006), necesita ser fosforilada para poder resolver las cromátidas hermanas.

Por último, teniendo en cuenta nuestros datos sobre la liberación parcial de RAD21 de los brazos cromosómicos durante la profase-I (Esquema 11), y sabiendo que recientemente se ha apuntado a WAPL como una de las reguladoras esenciales de este proceso (Shintomi y Hirano, 2009), podríamos especular que ya que únicamente algunos complejos de cohesina se unen a WAPL (Gandhi y col., 2006), puede que sean los complejos de cohesina con RAD21 aquellos que están unidos a WAPL. De este modo, en estos complejos de cohesina (que contienen RAD21 y el cofactor WAPL), WAPL podría estar mediando la liberación de RAD21 de los brazos cromosómicos durante la profase-I de ratón. Estas hipótesis son meramente especulativas, por lo que serán requeridos más estudios que las confirmen.

Para esclarecer los fundamentos moleculares que sustentan la variabilidad de complejos de cohesina, sería muy interesante para próximas investigaciones poder demostrar las diferentes combinaciones de subunidades de cohesina que hemos propuesto en esta memoria mediante la técnica de “*coinmunoprecipitación*”. Tampoco hay que descartar que en un futuro se demuestren nuevas combinaciones que amplíen el número de posibles complejos de cohesina que estén implicados en mitosis y/o meiosis, o que incluso se demuestre la existencia de variantes de cohesina hasta ahora desconocidas.

Por lo tanto, es deducible que ni existe un complejo de cohesina único y canónico, ni son éstos complejos los únicos responsables de mantener la cohesión entre cromátidas hermanas, sino que lo más probable es que exista una acción conjunta entre un conjunto de múltiples complejos de cohesina, sumado a otras proteínas que llamaremos “cohesivas”, y las uniones topológicas del DNA (como concatenaciones o intermediarios de Holliday) que reforzarían la cohesión entre cromátidas hermanas. Como se suele decir coloquialmente “*la unión hace la fuerza*”, y nunca mejor dicho en

éste fenómeno de la cohesión. Lo más probable es que ninguna de las opciones propuestas sería capaz de mantener la cohesión por sí sola, pero todas ellas unidas consiguen la estabilidad y el posterior desenlace de la unión entre las cromátidas hermanas dentro del correcto escenario espacio-temporal de la meiosis.



**Esquema 16.** Múltiples complejos de cohesina durante la meiosis de ratón. Se muestran esquemas de bivalentes autosómicos de metafase-I en los que se indica la distribución de las cohesinas. Los complejos 1 y 2 estarían presentes únicamente hasta diplotena y se localizarían a lo largo de los EAs y ELs del CS. Los complejos 3 y 4 estarían presentes en el dominio intercromatídico y en el subdominio vertical de la estructura tridimensional en “doble cornete” del centrómero. El complejo 3 es el complejo de cohesina “canónico” de mamíferos. El complejo 4 es la variante del complejo 3 en la que REC8 es sustituida por RAD21. El complejo 5 estaría localizado en el subdominio horizontal de la estructura tridimensional en “doble cornete” del centrómero. El complejo 6 estaría localizado en el dominio intercromatídico.

## **2. Regulación de la cohesión centromérica. La importancia de las Shugoshinas**

### **2.1. SGOL2 como protectora de la cohesión centromérica**

Las Shugoshinas son una familia de proteínas que fueron descritas por primera vez en levaduras (Kitajima y col., 2004) y de las cuales se conocen hasta la fecha dos variantes: SGOL1 y SGOL2. SGOL1 es esencial para la meiosis (Watanabe, 2005). En experimentos *Knockdown* (KD) se ha demostrado recientemente que SGOL2 colabora con la fosfatasa PP2A para la protección de REC8 en los centrómeros de cromosomas en metafase-I en ovocitos de ratón (Lee y col., 2008), de manera que la fosfatasa impide la fosforilación que desencadena la liberación de los complejos de cohesina de los cromosomas. Por este motivo, hemos intentado realizar la inmunodetección de PP2A en la meiosis de machos de ratón, pero desafortunadamente, tras realizar varios ensayos con diferentes anticuerpos (Tabla 2 de Material y Métodos) no pudimos observar ninguna reactividad positiva.

Debido a que todos nuestros intentos para analizar la distribución de SGOL1 durante la meiosis de ratón con diferentes anticuerpos (Tabla 2 en Material y Métodos) no han dado resultados fiables, centraremos la discusión sobre las Shugoshinas únicamente en la SGOL2.

En esta memoria de Tesis Doctoral se han expuesto los resultados relativos a la distribución de SGOL2, también conocida como Tripina (Kitajima y col., 2004), durante la meiosis de machos ratón. Estos resultados dieron como fruto la publicación de los primeros datos sobre la distribución de SGOL2 en la meiosis de mamíferos (Gómez y col., 2007). De acuerdo con lo propuesto previamente en la meiosis de *S. pombe* (Kitajima y col., 2004; Rabitsch y col., 2004), nuestros resultados demuestran que SGOL2 se localiza en el dominio centromérico interno durante la primera y la segunda división meiótica. Además, hemos encontrado que tanto SGOL2 como RAD21 adquieren una conformación a modo de “doble cornete” en los centrómeros en metafase-I y anafase-I. Sin embargo, REC8 colocaliza con SGOL2 únicamente en la región vertical de la estructura en forma de “T” en metafase-I y anafase-I. Estas distribuciones apuntan a que efectivamente es SGOL2 la encargada de proteger la cohesión centromérica en metafase-I tanto en los complejos que lleven RAD21 como en aquellos que porten REC8, y que por lo tanto esté cumpliendo una función análoga a la

de Sgo1/MEI-S332 en la meiosis de levaduras (Kitajima y col., 2004; Rabitsch y col., 2004) y *D. melanogaster* (Marston y col., 2004; Clarke y col., 2005), respectivamente.

Por otro lado proponemos que SGOL2 podría jugar un importante papel en la resolución tardía de la cohesión intercinetocórica en telofase-I (Esquema 17 A). Esto se explica teniendo en cuenta la distribución relativa que muestran SGOL2 y RAD21 durante la anafase-I y la telofase-I. RAD21 y SGOL2 colocalizan casi totalmente en una estructura en “doble cornete” en metafase-I. Sin embargo, en anafase-I tardía RAD21 cambia su distribución a pequeñas barras cercanas a los cinetocoros hermanos. En este momento, se sufre una ligera separación entre los cinetocoros hermanos, que tras la redistribución de RAD21 completan el primer paso de la pérdida de su interconexión. La participación de RAD21 en la cohesión intercinetocórica durante la primera división meiótica de ratón se propone en esta memoria y además ha sido publicada por Parra y col. (2004). Sin embargo, aunque RAD21 haya cambiado su conformación en anafase-I, SGOL2 sigue teniendo estructura en forma de “doble cornete” hasta la telofase-I tardía. A partir de este momento, sí que se observa una redistribución progresiva de SGOL2 desde una estructura en forma de “T” hasta su total desaparición, con la consecuente separación más pronunciada de los cinetocoros hermanos individualizados completándose el segundo paso de la pérdida de cohesión intercinetocórica. En intercinesis temprana ya no aparece ninguna señal de SGOL2, pero sin embargo persisten las barras de RAD21, y es en intercinesis tardía cuando reaparecen las señales de SGOL2 en las regiones centroméricas. Por lo tanto, la cohesión entre los cinetocoros hermanos estaría regulada durante la primera división meiótica por la presencia de RAD21 y SGOL2, cuyos cambios consecutivos de distribución permiten la separación secuencial y progresiva de los mismos.

En levaduras se ha sugerido que es REC8 la cohesina cortada proteolíticamente por la Separasa durante la transición metafase-II/anafase-II, y que por lo tanto es quien debe de estar protegida a nivel centromérico por la Sgo1 hasta la anafase-II (Buonomo y col., 2000; Kitajima y col., 2003a; Kitajima y col., 2004). Por otro lado REC8 es la única cohesina que nosotros hemos podido detectar en metafase-II. Por todo esto una de las pruebas más interesantes que hemos podido realizar es la doble localización de SGOL2 y REC8 durante la segunda división meiótica. Hemos podido comprobar que la pequeña señal de REC8 que persiste en los centrómeros en metafase-II aparece entre los cinetocoros hermanos, justo en medio de la correspondiente barrita de SGOL2. Además,

es curioso destacar que pueden encontrarse indistintamente señales de puntos simples o dobles de REC8 en medio de las barras de SGOL2 que conectan a los cinetocoros hermanos. Y lo que es más llamativo aún, cuando la señal de SGOL2 se redistribuye a dos pequeños puntos bajo los cinetocoros, podemos seguir encontrando señal de REC8 en el dominio centromérico interno. Más aún, en el 81% de las metafases-II que aparecen en las preparaciones aparecen únicamente 1 ó 2 bandas de SGOL2 entre los cinetocoros hermanos (Tabla y Gráficas 5 y 6), y entre todas estas señales de SGOL2 aparecen señales de REC8. Esto apunta a que probablemente la acción de la Separasa sobre la cohesión centromérica no es inmediata, sino que las subunidades de REC8 centroméricas están expuestas sin ser degradadas durante un relativo periodo de tiempo mientras los cromosomas están alineados en la placa de metafase-II, hasta que es ya al principio de la en anafase-II cuando son degradadas.

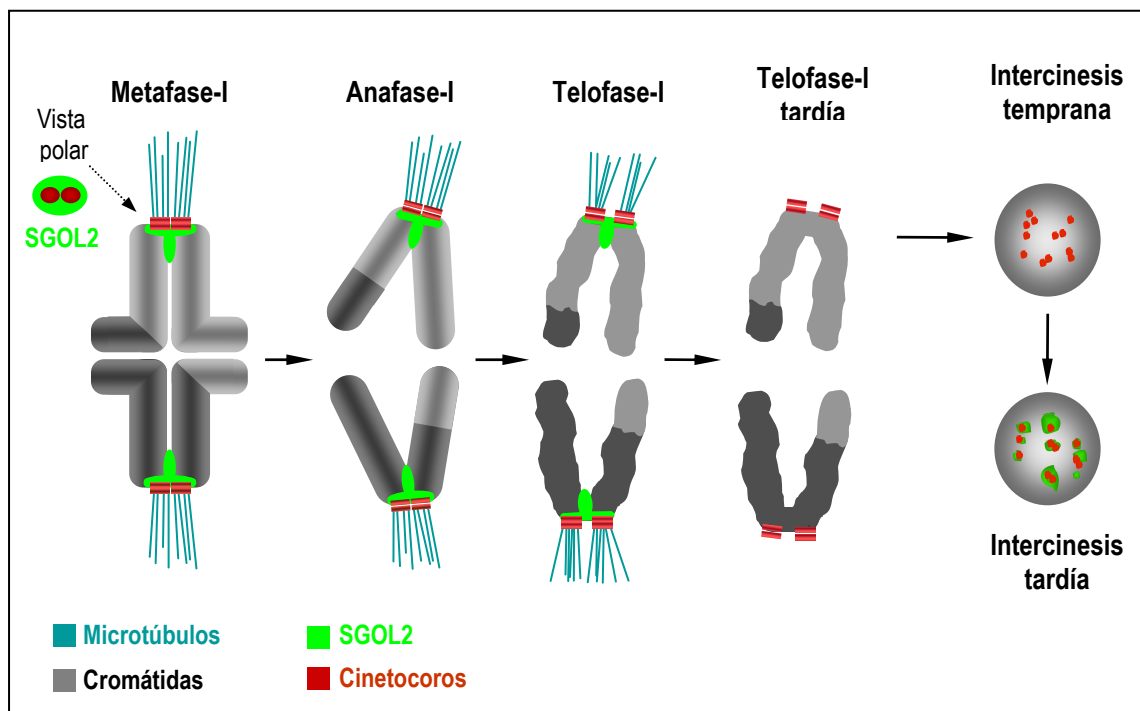
## 2.2. SGOL2 como sensora de tensión

Hemos demostrado que SGOL2 deja de ser detectada en núcleos de espermatocitos en intercinesis temprana, pero que a medida que avanza esta etapa vuelve a aparecer como pequeñas señales sobre los cromocentros hasta que comienza a diferenciarse como estructuras que conectan a los cinetocoros hermanos en profase-II. SGOL2 se redistribuye desde una barra que conecta los cinetocoros hermanos en metafase-II) a dos señales redondeadas bajo cada cinetocoro (Esquema 17 B). Además, también hemos mostrado que este cambio conformacional también se observa en mitosis de manera análoga a lo que ocurre con SGOL1 en células HeLa (McGuinness y col., 2005). Esta redistribución de SGOL2 también se observa para la quinesina despolimerizadora de MTs MCAK, lo cual ha sido reportado por Parra y col. en 2006, y sobre la cual ha sido demostrado que su redistribución es dependiente del establecimiento de la tensión generada por el huso (Andrews y col., 2004). También realizamos la doble inmunodetección de SGOL2 junto con la quinasas de control de entrada en anafase BubR1, la cual aparece intensamente sobre los cinetocoros cuando no hay tensión y se reduce a una pequeña señal en aquellos centrómeros que ya están en tensión (Taylor 2001). Con este experimento hemos podido demostrar que cuando SGOL2 aparece en forma de una banda que conecta los cinetocoros hermanos, éstos presentan una intensa señal de BubR1, lo que significa que no están sujetos a tensión. Sin embargo, cuando SGOL2 se redistribuye a dos pequeños puntos bajo los

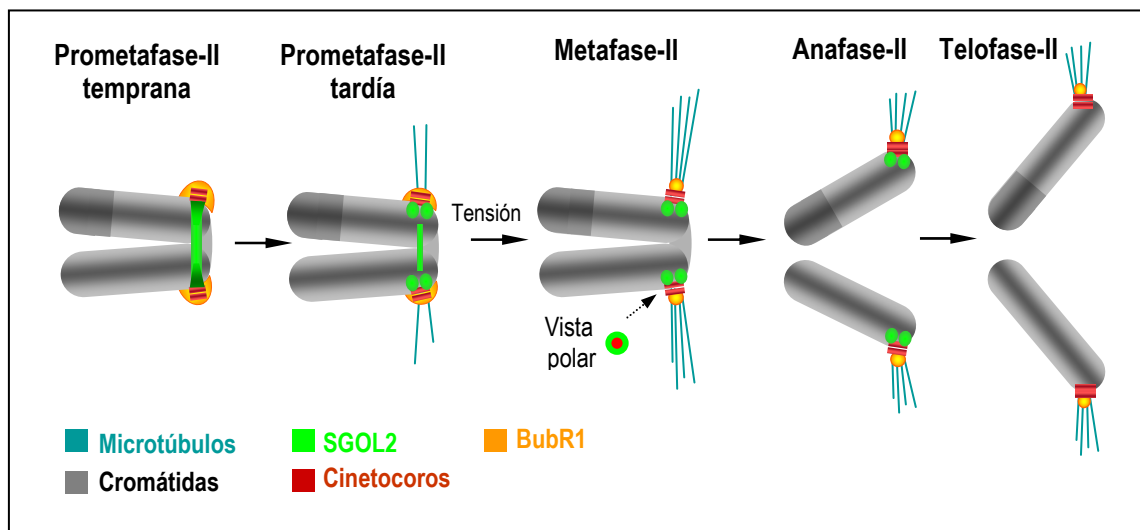


cinetocoros, la señal de BubR1 se reduce a un pequeño punto sobre los mismos como indicativo de que ya existe tensión en el centrómero. Estos resultados demuestran indirectamente que la localización de SGOL2 es dependiente de tensión. Esta hipótesis también fue reforzada cuando realizamos la triple inmunolocalización de SGOL2, Tubulina y los cinetocoros, con la que pudimos ver que SGOL2 aparece en forma de banda cuando los cinetocoros no tienen MTs enganchados, pero que en el momento en que éstos se enganchan a los cinetocoros, la señal de SGOL2 se redistribuye (Esquema 17 B). Como última prueba indirecta para comprobar si SGOL2 se comporta como sensora de tensión en espermatocitos en metafase-II realizamos tratamientos con Colchicina, una droga despolimerizadora de MTs. Con esta prueba observamos que en ausencia de MTs, SGOL2 aparece siempre como una señal conectora entre los cinetocoros, que tras este tipo de tratamientos aparecen siempre más próximos entre sí que en una situación normal.

Con todos estos resultados podemos proponer que SGOL2 participa en el fenómeno de reconocimiento de la tensión centromérica durante la metafase-II de espermatocitos de ratón (Esquema 17 A y B), probablemente de un modo parecido a lo propuesto para SGOL1 en mitosis (Salic y col., 2004; Indjeian y col., 2005). En este sentido, posteriormente a la publicación de éstos últimos resultados que se presentan en esta memoria y que se publicaron en el trabajo de investigación “*Mammalian SGOL2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis*” (Gómez y col., 2007), se demostró que efectivamente es también el complejo SGOL2/PP2A el que se relocaliza en metafase-II dependiendo de tensión también en ovocitos de ratón (Lee y col., 2008).



**Esquema 17 A.** Distribución de SGOL2 durante la primera división meiótica y la intercinesis de ratón.



**Esquema 17 B.** Distribución de SGOL2 durante la segunda división meiótica de ratón.

### 2.3. Estudio del modelo de ratón mutante para *sgol2*

Gracias a la colaboración establecida con el Dr. Alberto Pendás del CSIC-USAL de Salamanca pudimos analizar el comportamiento meiótico del modelo de ratón mutante para el gen *sgol2*.

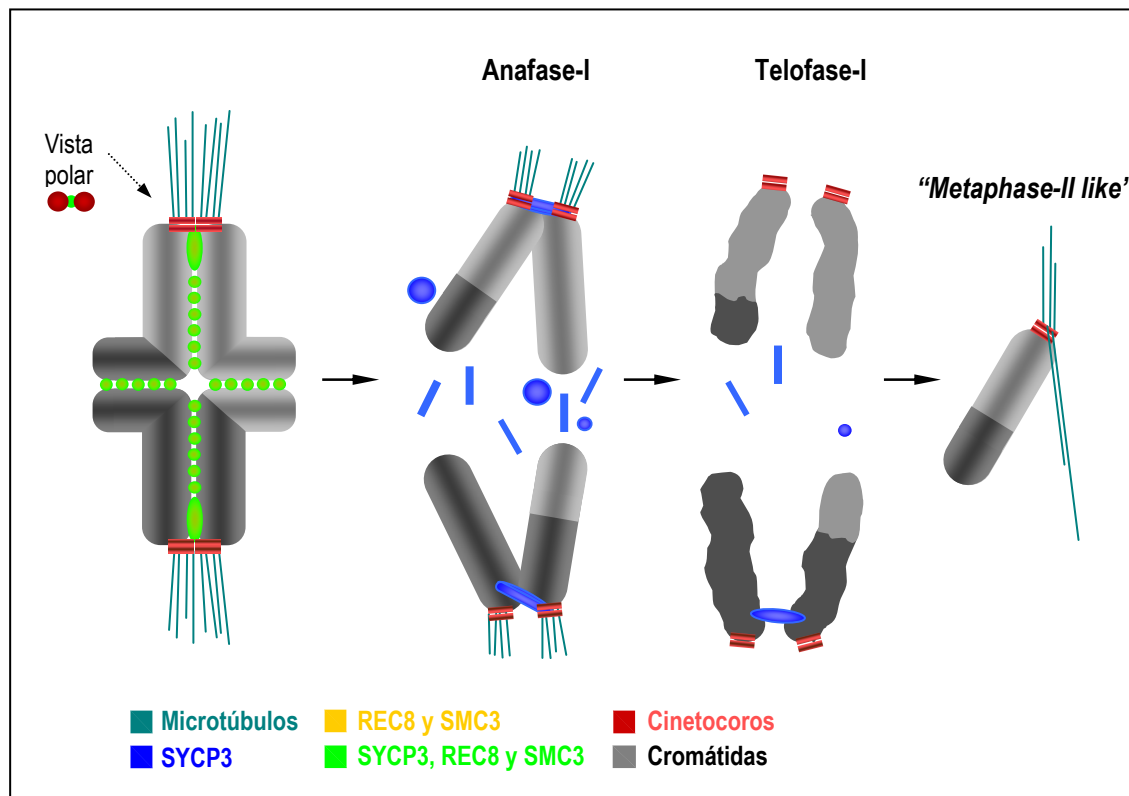
Los individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> tienen un desarrollo normal hasta la etapa adulta pero son infértiles. El grupo del Dr. Pendás demostró que ni los ratones heterocigotos ni los homocigotos para la delección del gen *sgol2* presentan alteraciones significativas en su desarrollo embrionario y postnatal, alcanzando los individuos la edad adulta sin ninguna anomalía, lo que implica que SGOL2 es dispensable para el correcto desarrollo de la mitosis (Llano y col., 2008). Pero en cambio, la meiosis sí se ve afectada en ausencia de SGOL2 ya que estos individuos son infértiles. Es importante aclarar aquí la diferencia entre individuos estériles e infértiles. Los individuos estériles son aquellos que son incapaces de procrear puesto que no forman gametos, y los individuos infértiles son aquellos que aunque poseen gametos (en cantidad normal o reducida), las aberraciones que portan los mismos hacen imposible una fecundación viable.

Se procedió al estudio de dos individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> machos cuyos pesos de los testículos fueron significativamente menores que los de un individuo normal. Se llegó a la conclusión de que en los individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> la dinámica de la proteína SYCP3 durante la profase-I es totalmente normal. Estos datos indican que la ausencia de SGOL2 no afecta aparentemente a los procesos de apareamiento, sinapsis y recombinación. De hecho, en estos mutantes la mayoría de las metafases-I son también normales. En estas metafases-I pudimos comprobar que aunque los bivalentes están bien alineados, la proteína SYCP3 tiene un patrón de distribución en ellos muy diferente a lo encontrado en los individuos normales (Esquema 18). En individuos mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> la proteína SYCP3 se localiza en el dominio intercromatídico de forma intensa, pero no aparece en el dominio centromérico interno como una estructura de “doble cornete”, sino como una pequeña señal con forma de punto bajo los cinetocoros hermanos íntimamente asociados. Es ya en anafase-I temprana cuando podemos apreciar más claramente las consecuencias de la ausencia de SGOL2 con la aparición de barras de SYCP3 entre los cinetocoros hermanos, y la pérdida prematura de la cohesión intercinetocórica. La manifestación citológica de este proceso puede observarse en que las señales de los cinetocoros hermanos en anafase-I están muy separadas. Es interesante discutir por qué puede producirse la correcta segregación en anafase-I si los

cinetocoros hermanos ya están separados. Este comportamiento se ha observado también en mutantes de *D. melanogaster* para MEI-S332 (Kerrebrock y col., 1995). Proponemos que la segregación en anafase-I es correcta en los mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> porque los cinetocoros hermanos ya habían orientado sintéticamente en metafase-I, y puesto que ya estaban unidos a MTs pueden segregarse correctamente en anafase-I aunque sea en esta transición metafase-I/anafase-I cuando se pierden al unísono las cohesiones braquial e intercinetocórica. En telofase-I también podemos observar la excesiva separación de los cinetocoros hermanos comparada con la que se encuentra en individuos normales (Tabla y Gráfico 9), lo cual demuestra que en ausencia de SGOL2 la pérdida de la cohesión centromérica se adelanta a la transición anafase-I/telofase-I. Podemos suponer por tanto que en telofase-I tardía de individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> se ha perdido ya la cohesión tanto en brazos como en centrómero y que cada núcleo posee 40 cromátidas sueltas cada una de ellas con un único cinetocoro.

Tal y como hemos propuesto en apartados anteriores, RAD21 participa en la cohesión intercinetocórica hasta telofase-I tardía en individuos normales. Esto puede ofrecer otra explicación a por qué en individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> las cromátidas permanecen unidas hasta telofase-I aunque los cinetocoros hermanos ya estén separados, ya que puede que existan complejos de cohesina centroméricos con RAD21 que no sean cortados por la Separasa en ausencia de SGOL2. Únicamente se ha demostrado en la meiosis de ratón que la Separasa corta a la cohesina REC8 para la liberación de los complejos de cohesina (Kudo y col., 2006), pero hasta el momento no existen datos de la actividad proteolítica de la Separasa sobre RAD21. Por motivos técnicos no hemos podido inmunolocalizar de manera fiable RAD21 en los espermatocitos del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, el hecho de encontrar señales de SYCP3 entre los cinetocoros hermanos separados en anafase-I tardía de *Sgol2*<sup>-/-</sup> (Esquema 18), y sabiendo que SYCP3 y RAD21 colocalizan totalmente a lo largo de todas las etapas de la meiosis en WT (Parra y col., 2004), no podemos descartar que puedan existir también señales de RAD21 entre los cinetocoros hermanos separados en la anafase-I de *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Estas posibles señales intercinetocóricas de RAD21 en anafase-I podrían ser responsables de mantener cierta cohesión intercinetocórica hasta la telofase-I del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Esta suposición deberá ser contrastada en un futuro cuando podamos disponer de anticuerpos anti-RAD21 que rindan reactividad positiva. Por otro lado, no podemos tampoco descartar la existencia de un mecanismo independiente de los complejos de cohesina en

el que participe Topo II, que mantenga cierta cohesión centromérica entre las cromátidas hermanas durante la anafase-I de *Sgol2*<sup>-/-</sup> una vez que los complejos de cohesina con REC8 hayan sido totalmente liberados.



**Esquema 18.** Distribución de SYCP3 y de las cohesinas REC8 y SMC3 desde la metafase-I hasta la telofase-I en el modelo de ratón mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup>.

Los datos que obtuvimos para las cohesinas REC8 y SMC3 en individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> confirman lo encontrado con SYCP3 (Esquema 18). Las señales de REC8 y SMC3 en metafase-I son idénticas en WT y *Sgol2*<sup>-/-</sup>. Sin embargo, REC8, que en WT aparece como pequeñas señales en forma de coma bajo los cinetocoros hermanos en anafase-I, se pierde totalmente de los centrómeros en la anafase-I temprana en individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> (Esquema 18). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la dinámica de REC8 en el ratón mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> es muy diferente a la que hemos observado en individuos normales, en contraposición a otros resultados anteriormente propuestos en la meiosis de *S. pombe* en los cuales la ausencia de Sgo2 no afecta a la localización y dinámica de GFP-Rec8 (Rabitsch y col., 2004).

Sabiendo que estudios en levaduras (Buonomo y col., 2000), y recientemente en ratón (Kudo y col., 2006), han demostrado que la Separasa corta a REC8 en los

complejos de cohesina braquiales para entrar en anafase-I, la ausencia de SGOL2 permitiría que los complejos de cohesina centroméricos con REC8 fueran fosforilados y por tanto que quedaran expuestos a la acción de la Separasa. Sería entonces en la transición metafase-I/anafase-I de individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> cuando la Separasa degradaría a los complejos de cohesina centroméricos con REC8 provocando la pérdida prematura de las cohesiones centromérica e intercinetocórica. La explicación a este proceso radica en que en ausencia de SGOL2, los complejos de cohesina centroméricos no pueden ser defosforilados puesto que, presumiblemente, y de manera análoga a lo propuesto en ovocitos de ratón (Lee y col., 2008), la ausencia de SGOL2 impide la localización de PP2A en los centrómeros. Por este motivo, con objeto de verificar la presencia o ausencia de la fosfatasa, hemos intentado inmunolocalizar PP2A en los espermatoцитos del mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> con diferentes anticuerpos (Tabla 2 en Material y Métodos), pero desafortunadamente ninguno de ellos rindió reactividad positiva en individuos WT. Sería muy interesante también estudiar en los individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> si la pérdida de la cohesión intercinetocórica que observamos en anafase-I temprana es efectivamente dependiente de la actividad proteolítica de la Separasa, como ocurre con la liberación de la cohesión braquial en metafase-I/anafase-I (Kudo y col., 2006). Sin embargo, nosotros no podemos comprobarlo con nuestra metodología, puesto que no podemos localizar a la Separasa para analizar su dinámica, ni tampoco podemos realizar hasta el momento ensayos enzimáticos. De igual manera, no podemos descartar que en ausencia de SGOL2 puedan existir en los centrómeros mecanismos alternativos para la liberación de los complejos de cohesina centroméricos que sean independientes de Separasa como los que actúan en los brazos cromosómicos durante la profase mitótica (Waizenegger y col., 2000). Por último, sería muy interesante estudiar la dinámica de SGOL1 en ausencia de SGOL2 en estos mutantes, pero debido a que los resultados obtenidos con los anticuerpos anti SGOL1 de los que disponemos son dudosos (Tabla 2 en Material y Métodos), no hemos podido por el momento llegar a ninguna conclusión.

La pérdida prematura de la cohesión centromérica en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> provoca que en metafase-II los espermatoцитos se caractericen por poseer todas sus cromátidas sueltas. A estas células las llamamos “*metaphase-II like*” y en ellas las cromátidas no pueden orientar en placa puesto que sólo tienen un cinetocoro. Esto provoca que al intentar realizarse una segregación en “*anaphase-II like*”, la mayoría de estas células degeneren y que sólo algunas consigan escapar al SAC. Para analizar con mayor detalle

en qué medida se ve afectado el SAC cuando aparecen cromátidas sueltas en “*metaphase-II like*” en ausencia de SGOL2, realizamos la inmunodetección de la proteína de la lámina cinetocórica externa CENP-E (Lombillo y col., 1995) y de la quinasa BubR1, pues se ha propuesto que ambas proteínas están implicadas en este SAC (Chan y col., 1999; Parra y col., 2002). El SAC es capaz de detectar uniones erróneas de los cinetocoros a los MTs y la falta de tensión centromérica, y que de producirse, la entrada en anafase quedaría bloqueada (Fang y col., 1998; Hassold y Hunt, 2001; Kouznetsova y col., 2007). CENP-E (Parra y col., 2002) y BubR1 (Chan y col., 1999) aparecen con una intensa señal sobre los cinetocoros que no han anclado MTs y en aquellos centrómeros no sujetos a tensión, respectivamente, persistiendo una pequeña y poco intensa señal cuando ya lo han hecho. Pudimos observar que la localización y dinámica de CENP-E durante la primera división meiótica en individuos *Sgol2<sup>-/-</sup>* es totalmente normal. En los espermátocitos en profase-II del mutante *Sgol2<sup>-/-</sup>* lógicamente todas las señales de CENP-E sobre los cinetocoros son intensas y grandes, lo que significa que ninguno de ellos se ha unido a MTs todavía. Pero curiosamente, las señales de CENP-E siguen siendo intensas en todos los cinetocoros en “*metaphase-II like*”, lo que demuestra que las cromátidas sueltas nunca consiguen orientar correctamente en placa. En “*anaphase-II like*” observamos que algunas cromátidas consiguen engancharse a MTs y migrar a uno de los polos, pero en la mayoría de ellas persisten intensas señales de CENP-E. Podemos decir que estas células están en anafase porque observamos filamentos de CENP-E en la zona media del huso, lo cual está descrito en las anafases meióticas de individuos WT (Parra y col., 2002). Finalmente, en algunas “*telophase-II like*” observamos que las cromátidas sueltas consiguen migrar a dos polos más o menos identificables, pero que otras de ellas quedan retrasadas en la presunta zona media del huso con una intensa señal de CENP-E. Los datos que obtuvimos con la inmunolocalización de BubR1 corroboran los resultados de CENP-E que apuntan a que las cromátidas sueltas de “*metaphase-II like*” no consiguen biorientar en placa. Al igual que ocurre con CENP-E, BubR1 marca intensamente todos los cinetocoros de las cromátidas sueltas de “*metaphase-II like*”. Los datos obtenidos para CENP-E y BubR1 demuestran que el SAC está activado en los espermátocitos en “*metaphase-II like*” debido a la imposibilidad de biorientar de las cromátidas sueltas.

Para analizar en mayor detalle el comportamiento de los cinetocoros con respecto a los MTs en los individuos *Sgol2<sup>-/-</sup>*, y muy especialmente durante las “*metaphase-II*

*like*”, realizamos la inmunolocalización de  $\alpha$ -Tubulina. Con este experimento pudimos demostrar que la unión sintética de los cinetocoros hermanos en metafase-I se produce correctamente, pero que en “*metaphase-II like*” y “*anaphase-II like*” se producen multitud de uniones merotéticas de cromátidas sueltas debido a que al poseer un único cinetocoro, no pueden biorientar correctamente en la placa metafásica.

Algunas de estas células en “*metaphase-II like*” en las que se producen uniones erróneas de los cinetocoros a los MTs, y en las que el SAC permanece activado, se saltan el mecanismo de control de entrada en anafase y generan segregaciones desequilibradas. No obstante, la mayoría de las “*metaphase-II like*” y “*anaphase-II like*” entran en una presunta apoptosis. En este punto es importante aclarar que lo que nosotros hemos denominado células en apoptosis, basándonos en su reducido tamaño, la hipercondensación de la cromatina y la ausencia de marcaje de las proteínas inmunolocalizadas, son realmente células en lo que podríamos llamar “catástrofe meiótica”, un tipo de muerte celular análoga a lo propuesto previamente para la denominada catástrofe mitótica (Vakifahmetoglu y col., 2008; Kroemer y col., 2009). Se decidió utilizar el término apoptosis puesto que la terminología “catástrofe meiótica” todavía no está establecida, aún siendo conscientes de que no hemos demostrado que efectivamente se trate o no de apoptosis debido a que las técnicas de detección de la misma sobre espermátocitos aplastados no dan resultados fiables. Para analizar más detalladamente estos tipos de células se realizó un conteo del número de espermátocitos en apoptosis en cada etapa (Tabla y Gráfico 7). Los datos demuestran que, si bien hay apoptosis esporádicas durante la primera división meiótica, la mayor entrada en muerte celular programada en el mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> se produce a partir de la etapa de “*metaphase-II like*” debido a la incapacidad de alinear en placa las cromátidas sueltas. Pudimos contabilizar las escasas células en las que grupos heterogéneos de cromátidas sueltas finalmente si han podido llegar a “*telophase-II like*”, y que tras la reconstitución de la EN, dan lugar a espermátidas aneuploides que contienen entre 1 y 40 cinetocoros (Tabla y Gráfico 8). Curiosamente, pudimos observar que las espermátidas anómalas desequilibradas podían tener desde un solo cinetocoro hasta 40, apareciendo un porcentaje bastante parecido de espermátidas redondas con 1-10, 10-20, 20-30 ó 30-40 cinetocoros. Sin embargo, muy raramente pudimos encontrar espermátidas alargadas con menos de 10 señales cinetocóricas, siendo el grupo con mayor porcentaje de aparición aquél que agrupa las espermátidas con 20-30 cinetocoros (Tabla y Gráfico 8).



Esto quiere decir que rara vez las espermatidas redondas que tiene menos de 10 cromátidas maduran a un estadio posterior, y sólo aquellas que porten al menos 10 cromátidas serán capaces de progresar en su maduración durante la espermiogénesis, aunque, como es de esperar, aparezcan morfologías y tamaños de núcleos aberrantes provocados por las aneuploidías. Estas aneuploidías son presumiblemente responsables de la infertilidad de los individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup>.

Por último, quisimos comprobar si al igual que ocurre en mitosis (Huang y col., 2007), SGOL2 es necesaria para el reclutamiento de MCAK al dominio centromérico interno durante la meiosis. Nuestros datos demuestran que en ausencia de SGOL2 durante la meiosis de ratón, MCAK no se asocia al centrómero. En la inmunolocalización de MCAK en metafase-I y “*metaphase-II like*” de individuos *Sgol2*<sup>-/-</sup> pudimos observar aglomerados citoplasmáticos de MCAK que probablemente se produzcan cuando esta proteína intenta anclarse a los centrómeros, pero que al no conseguirse pues no existe SGOL2 alguna que la reclute, se autoensambla en el citoplasma.

La mayoría de los modelos mutantes para proteínas implicadas en la cohesión entre cromátidas hermanas presentan su meiosis bloqueada durante la profase-I (de Rooij y de Boer, 2003), como el caso de los ratones mutantes para SMC1β (Revenkova y col., 2004; Hodges y col., 2005; Novak y col., 2008) y para REC8 (Bannister y col., 2004; Xu y col., 2005). Sin embargo, los experimentos realizados en el modelo de ratón mutante *Sgol2*<sup>-/-</sup> han permitido despejar muchas incógnitas sobre el comportamiento de los cromosomas meióticos de ratón tras la pérdida prematura de la cohesión centromérica durante la meiosis-I. Nuestros resultados sobre el comportamiento meiótico de los ratones mutantes *Sgol2*<sup>-/-</sup> nos llevaron a afirmar en el trabajo de investigación titulado “*Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not mitotic cell division in mice*” (Llano y col., 2008) que SGOL2 es responsable de la protección de la cohesión centromérica hasta la anafase-II y que por tanto es una proteína imprescindible para la correcta progresión de la meiosis de ratón.

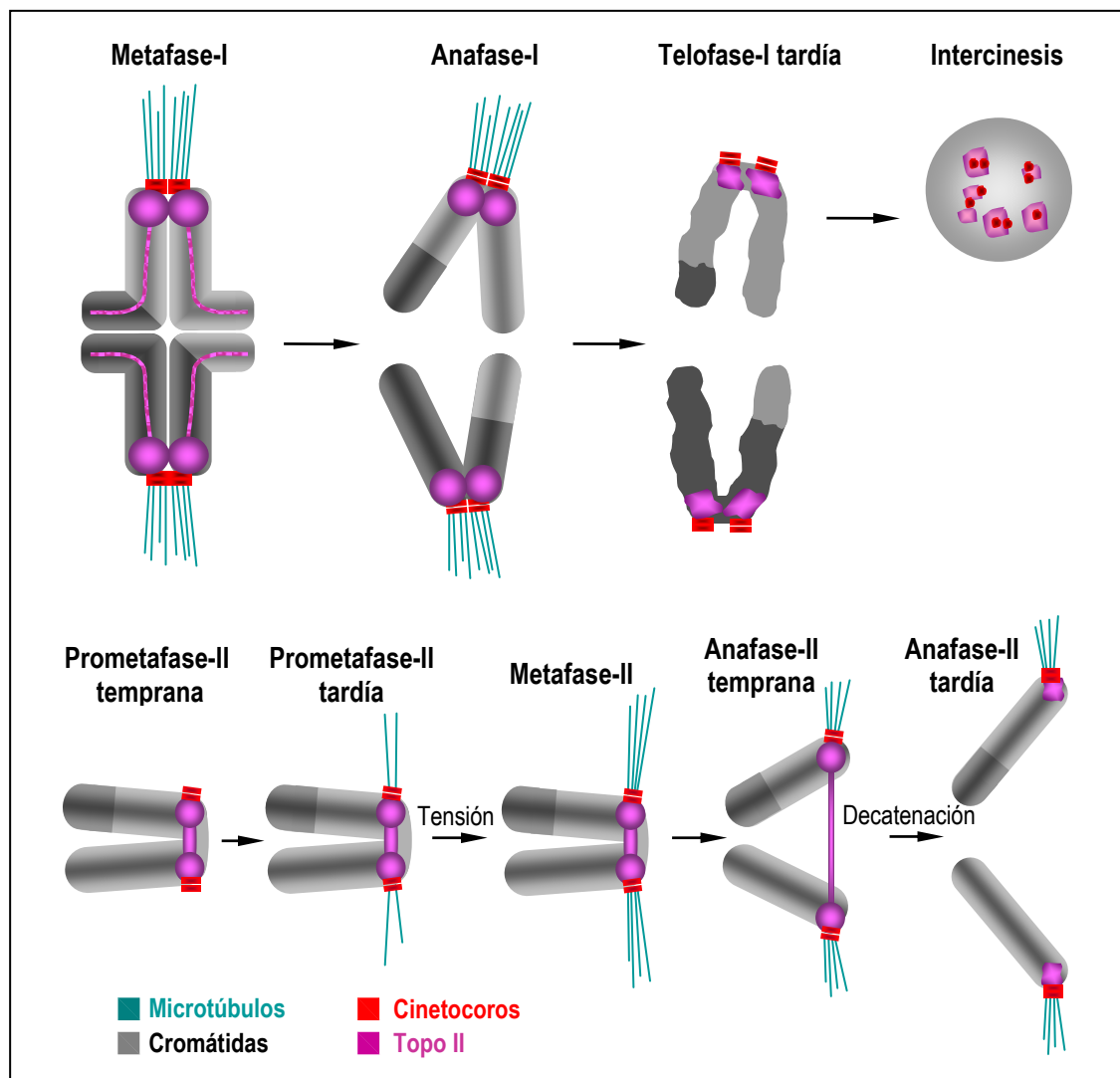
### **3. Implicaciones de Topo II en la meiosis de ratón**

#### **3.1. Dinámica y funciones de Topo II**

En los últimos años se ha propuesto que las cromátidas hermanas están también unidas molecularmente mediante concatenaciones de DNA que son independientes de los complejos de cohesina (Sonoda y col., 2001; Sullivan y col., 2004). Tanto en mitosis como en meiosis la actividad decatenadora de Topo II ha sido implicada en la segregación entre cromátidas hermanas en las anafases en levaduras (DiNardo y col., 1984; Holm y col., 1985; Koshland y Hartwell, 1987; Uemura y col., 1987; Rose y col., 1990), *X. laevis* (Shamu y Murray, 1992) y mamíferos (Downes y col., 1991; Clarke y col., 1993; Cobb y col., 1997).

En mitosis Topo II se ha localizado acumulada en los centrómeros y a lo largo de los ejes cromatídicos en diferentes especies de mamíferos y en *D. melanogaster* (Taagepera y col., 1993; Rattner y col., 1996; Sumner, 1996; Steffensen y col., 2001; Christensen y col., 2002; Null y col., 2002; Tavormina y col., 2002; Coelho y col., 2003), y marcando toda la cromatina en cromosomas de *X. laevis* (Hirano y Mitchison, 1994). Sin embargo, los pocos estudios de la localización de Topo II en meiosis son cuanto menos contradictorios. Nuestros resultados demuestran que Topo II se localiza exclusivamente en los centrómeros durante la profase-I. Estos resultados concuerdan con datos previos publicados sobre la profase-I de ratón (Cobb y col., 1999b). No obstante, en contraposición a estudios previos realizados en gallo y *Bombyx mori* (Moens y Earnshaw, 1989; Moens, 1990), nosotros nunca hemos detectado Topo II a lo largo de los ELs. A partir de la profase-I, no existe ningún dato publicado que muestre detalladamente el patrón de localización de Topo II en la meiosis de mamíferos. Nuestros resultados demuestran que en metafase-I Topo II aparece como dos grandes señales redondeadas bajo los cinetocoros hermanos así como a lo largo de los ejes cromatídicos (Esquema 19). En cromosomas en metafase-II, Topo II marca unas grandes señales bajo los cinetocoros y una banda que los conecta y que se va estirando a medida que avanza la anafase-II, desapareciendo finalmente en anafase-II tardía (Esquema 19). Este patrón de localización ha sido corroborado tanto en aplastado como en esparcido.

Además, hemos localizado Topo II en los cromosomas mitóticos en espermatogonias, en las cuales Topo II marca los centrómeros y los ejes cromatídicos de forma muy tenue tanto en aplastado como en esparcido.



**Esquema 19.** Distribución de Topo II durante la meiosis de ratón.

La localización que observamos de Topo II durante la primera división meiótica aporta evidencias suficientes para implicarla en el mantenimiento de la estructura cromosómica, debido principalmente a su marcaje a lo largo de los ejes cromatídicos (Esquema 19), que se corresponden con el *scaffold* (Moens y Earnshaw, 1989; Rufas, 1992; Suja y Rufas, 2008). El marcaje de Topo II que nosotros observamos a lo largo de los ejes cromatídicos en metafase-I es parecido al observado para las condensinas de tipo I (Viera y col., 2007). Esto hace pensar que Topo II está implicada en la condensación cromosómica en colaboración con las condensinas en la meiosis de ratón,

tal y como se ha propuesto previamente para los cromosomas mitóticos de células humanas y de *D. melanogaster* (Coelho y col., 2003; Maeshima y Laemmli, 2003; Hirano, 2005). Asimismo, el marcaje de Topo II bajo los cinetocoros hermanos indica también que puede que influya en el mantenimiento de la estructura de los centrómeros, aspecto que ya se ha propuesto con anterioridad en cromosomas mitóticos (Rattner y col., 1996; Christensen y col., 2002).

Durante la segunda división meiótica hemos observado una localización de Topo II mucho más significativa que la hace parecer una importante candidata para la regulación de la cohesión centromérica (Esquema 19). Se ha demostrado en mitosis que es posible la biorientación cromosómica en la metafase cuando se interfieren conjuntamente Topo II y proteínas implicadas en el complejo de cohesina. Estos estudios se realizaron sobre células DT40 de pollo, en las que cuando se inactiva el complejo de cohesina se produce un bloqueo en prometafase en el que los cromosomas son incapaces de alinearse en placa (Sonoda y col., 2001). Sin embargo, si en estas mismas células se inactiva también Topo II la alineación cromosómica queda restaurada y los niveles de BubR1 se normalizan (Vagnarelli y col., 2004). Estas mismas observaciones se han visto también en *S. cerevisiae* (Dewar y col., 2004), aunque existe una publicación contradictoria en la que se sugiere que Topo II no es capaz de recuperar el fenotipo de los mutantes deficientes en el cofactor del complejo de cohesina Pds5 (Aguilar y col., 2005). De igual modo, en *D. melanogaster*, la ausencia conjunta de cohesinas y condensinas, las cuales están estrechamente relacionadas con Topo II (Hirano, 2005), elude los efectos de la pérdida de cohesión (Coelho y col., 2003). Todos estos datos indican que si se inhibe la actividad del complejo de cohesina en mitosis, la acción de Topo II está impidiendo la alineación en placa de los cromosomas, es decir, impide el progreso hacia la segregación en anafase. Esto puede sugerir que para que Topo II influya en la segregación centromérica, primero han tenido que liberarse los complejos de cohesina centroméricos. Nuestros datos apoyan esta hipótesis de manera paralela durante la metafase-II de ratón, puesto que hemos demostrado que la liberación de la cohesión cromosómica ocurre en dos pasos, el primero dependiente de la liberación de los complejos de cohesina centroméricos, y el segundo dependiente de la actividad decatenadora de Topo II, pero que ambas etapas han de ser consecutivas y en ese orden preciso. La observación citológica que apoya esta hipótesis es el hecho de encontrar filamentos de cromatina entre las cromátidas

hermanas separadas en anafase-II temprana, en las que aparece Topo II, y en las que ya no existe marcaje de REC8. Sólo cuando todas estas conexiones de cromatina entre las cromátidas hermanas desaparecen bajo la acción decatenadora de Topo II, se permitirá el segundo y último paso de la liberación de la cohesión centromérica en anafase-II y por consiguiente la total segregación ecuacional de las cromátidas hermanas. Si bien existen estudios previos realizados en la meiosis de ratón (Cobb y col., 1997) que ya apuntaban a la participación de Topo II en la segregación de cromátidas hermanas, esto era demostrado mediante ensayos de actividad enzimática, y tratamientos con ácido okadaico, pero no se estudió su fundamento citológico en detalle. Por ello, en esta memoria de Tesis Doctoral se ha querido mostrar por primera vez el patrón espacio-temporal de la localización de Topo II durante la meiosis de ratón, y que como hemos demostrado apunta directamente a su papel regulador de la cohesión centromérica en meiosis-II. Por tanto, nuestros resultados concuerdan con estudios previos que analizaban el comportamiento meiótico de mutantes de Topo II en *S. cerevisiae* (DiNardo y col., 1984; Koshland y Hartwell, 1987), *S. pombe* (Holm y col., 1985; Uemura y col., 1987) y *X. laevis* (Shamu y Murray, 1992).

Finalmente, podemos resumir que todos nuestros resultados sobre la dinámica de Topo II en la meiosis de ratón apoyan más favorablemente el “modelo cualitativo” que explica el papel que desempeña Topo II en la cohesión centromérica durante la mitosis (Porter y Farr, 2004; Luo y col., 2009), el cual se centra en que Topo II actúa diferencialmente en la región centromérica y regula e interviene activamente en la pérdida de la cohesión centromérica en anafase.

### **3.2. Efectos de la inhibición de Topo II**

En los últimos años se han publicado diversos estudios sobre los efectos de la inhibición de Topo II sobre la división celular. En primer lugar, existen datos en mitosis utilizando RNAi para interferir la expresión de Topo II de células S2 de *D. melanogaster* y células HeLa que determinan que en ausencia aparente de la enzima aparecen multitud de puentes entre las cromátidas en anafase (Chang y col., 2003). Sin embargo, estos estudios no aportan ningún dato sobre la localización de proteínas centroméricas ni sus posibles modificaciones en ausencia de Topo II. También se han realizado ensayos de RNAi en células HeLa con los que se bloquea la síntesis de Topo II $\alpha$ , Topo II $\beta$  o ambas (Sakaguchi y Kikuchi, 2004). En este trabajo se demuestra que

aparecen puentes cromosómicos en el 20% de las células en las que se ha inactivado Topo II $\alpha$ . Estos datos concuerdan con diversos trabajos realizados en los que se afirma que Topo II $\alpha$ , y no Topo II $\beta$ , es indispensable para la correcta segregación cromosómica mediante ensayos de actividad enzimática en ratón (Woessner y col., 1991) y humanos (Chaly y col., 1996; Grue y col., 1998) y RNAi en ratón (Akimitsu y col., 2003). En tercer lugar, también se ha estudiado la inhibición de la función de Topo II $\alpha$  mediante el silenciamiento condicional del gen responsable de su codificación en la línea HT1080 de células humanas en las que la segregación cromosómica se ve gravemente comprometida desencadenando apoptosis (Carpenter y Porter, 2004). Por último, pueden emplearse drogas como ET (Marchetti y col., 2001), ICRF-193 o Merbarona para bloquear la funcionalidad y/o la localización de Topo II (Nitiss, 2009b). Nosotros hemos elegido este último método de inhibición de Topo II, el cual hemos realizado mediante inyecciones intraperitoneales de ET a diferentes concentraciones (50-200 mg/kg) y tiempos (5-96 horas). Estos experimentos han posibilitado corroborar todos nuestros resultados sobre la dinámica y funciones de Topo II durante la meiosis de ratón.

Con nuestros resultados hemos podido observar que el ET provoca la aparición de células en “*zygotene like*” que presentan morfologías extrañas de la proteína SYCP3 del CS (Tabla 10 y Tablas y Gráficos 11), por lo que no podemos descartar que Topo II pueda influir de algún modo en el establecimiento o mantenimiento de la sinapsis. La aparición de univalentes en metafase-I, y la observación de puentes, retrasos y fragmentos de cromatina en anafase-I (Tabla 10 y Tablas y Gráficos 11) corroboran que Topo II está involucrada en el mantenimiento de la estructura del bivalente y en la segregación de homólogos en anafase-I. Estos datos concuerdan con publicaciones anteriores que describían los efectos del ET sobre espermatocitos de ratón (Kallio y Lahdetie, 1996; Marchetti y col., 2001). Es interesante comentar que para una misma concentración de droga, observamos que a tiempos cortos de actuación aparecen altos porcentajes de retrasos en telofase-I, pero a tiempos más largos esos porcentajes bajan acercándose a los porcentajes de retrasos que se observan en ensayos de KD (*Knock down*) realizados sobre cromosomas mitóticos de células HeLa (Sakaguchi y Kikuchi, 2004). Esto puede señalar que los efectos a largo plazo del ET son equiparables a los de la inhibición de la síntesis de la proteína. Por otro lado también es interesante destacar que el porcentaje de telofase-I apoptóticas con retrasos aumenta a mayor tiempo de

exposición a la droga, lo que quiere decir que los retrasos cromosómicos inducen la apoptosis, o más correctamente, una “catástrofe meiótica” equiparable morfológicamente a la catástrofe mitótica (Vakifahmetoglu y col., 2008; Kroemer y col., 2009). Por último, la aparición de puentes y retrasos en anafase-II (Tabla 10 y Tablas y Gráficos 11) corrobora que Topo II está involucrada en la segregación de cromátidas hermanas durante la segunda división meiótica.

Como última observación a las conclusiones que hemos obtenido sobre los efectos de la inhibición de Topo II con ET en espermatoцитos de ratón, hemos de comentar que, tanto para la primera división meiótica como para la segunda, la diferencia encontrada entre las bajas concentraciones de ET (50 mg/kg) y las dosis altas (200 mg/kg) radica fundamentalmente en el índice de apoptosis. Es decir, que a mayor concentración de droga, mayor apoptosis podemos observar. La entrada en apoptosis es consecuencia del bloqueo en anafase-I y anafase-II tras la aparición de puentes entre las cromátidas hermanas que imposibilitan una segregación correcta. Sin embargo, el número de puentes entre cromátidas no aumenta a mayor concentración de la droga, lo que puede significar que las células admiten un número limitado de puentes de cromatina, por lo que únicamente podremos observar en anafase aquellas células que tengan pocos puentes. Probablemente, aquellas células que contuvieran un gran número de puentes entre las cromátidas quedarían bloqueadas en una anafase-II muy temprana, por lo que se desencadenaría una “catástrofe meiótica” y comenzarían los procesos de muerte celular programada. Quizás sea por este motivo por lo que no hemos podido observar anafases-II avanzadas con gran multitud de puentes de cromatina. Sin embargo, no podemos descartar que el ET sea incapaz de inducir efectos más graves de los observados en la segregación cromosómica, y por lo tanto, futuras investigaciones deban centrarse en probar el empleo de otras drogas tales como el ICRF-193. Este último inhibidor impide a la vez la localización y también la acción de las Topoisomerasas II $\alpha$  y  $\beta$  (Huang y col., 2001), y a diferencia del ET, bloquea la actividad de Topo II justo antes del religamiento de las hebras de DNA (Nitiss, 2009b). Ya que existen datos previos que describen fallos en la segregación y aberraciones cromosómicas tras el empleo de ICRF-193 en mitosis (Clarke y col., 1993; Mikhailov y col., 2002) y en meiosis (Mikhailov y col., 2002; Tateno y Kamiguchi, 2002), estamos interesados en realizar estudios que certifiquen qué efectos concretos puede provocar la administración del ICRF- 193 en la meiosis de ratón, y si esos efectos son comparables

o no a los que hemos observado con el ET. Además, existe un trabajo realizado sobre células humanas en el que se ha demostrado que tras la inhibición de Topo II con ICRF-193 aparecen muchas más hebras de PICH entre los cromosomas en anafase que en una situación normal (Baumann y col., 2007). Sería muy interesante observar en nuestras preparaciones de espermátocitos de ratón tras el tratamiento con ET, y también en futuros experimentos con ICRF-193, si los puentes de cromatina que aparecen en anafase-I y anafase-II se marcan con PICH. Desafortunadamente, tal y como hemos presentado en el apartado de resultados, los anticuerpos contra PICH de los que disponemos han funcionado bien en mitosis, pero nunca nos han dado buenos resultados en meiosis, por lo que tendremos que esperar a la obtención de nuevos anticuerpos contra PICH con reactividad positiva en meiosis.

### 3.3. Regulación de la actividad decatenadora de Topo II

Se ha propuesto que la actividad decatenadora de Topo II en la interfase como en la transición metafase/anafase está regulada por su fosforilación por parte de PLK1 (Li y col., 2008). Por este motivo, hemos intentado analizar la localización de PLK1 en la meiosis de ratón para tratar de averiguar cuál es su patrón de localización, y si colocaliza o no con Topo II. Hemos podido detectar que el anticuerpo comercial de la casa Abcam contra PLK1 (ver Tabla 2 de Material y Métodos) marca los cinetocoros tanto en metafase-I como en metafase-II, así como los polos celulares (imágenes no mostradas). Con este patrón de localización no tenemos por el momento evidencias suficientes para inferir un modelo que explique cómo PLK1 puede estar regulando a Topo II durante la meiosis de ratón, por lo que serán necesarios más estudios para poder esclarecer estos mecanismos.

Por otro lado, se ha propuesto también que la funcionalidad de Topo II durante la mitosis está determinada por su fosforilación por diferentes quinasas (Wells y Hickson, 1995; Ishida y col., 1996; Kimura y col., 1996), siendo una de ellas Aurora B (Morrison y col., 2002). Además, se ha demostrado en mitosis que la actividad de Topo II es dependiente de sumoilación en *X. laevis* (Azuma y col., 2003) y en *S. cerevisiae* (Bachant y col., 2002). En células humanas, aunque se ha demostrado que existen las formas sumoiladas de Topo II $\alpha$  y Topo II $\beta$  (Mao y col., 2000), todavía no hay datos que demuestren que ambas Topoisomerasas deban de estar sumoiladas para estar activas.



En líneas generales se conoce que la ruta de sumoilación/activación de Topo II está regulada por la acción de varias proteínas: SUMO (SUMO 1 y SUMO 2/3), SUMOE2 (UBC9) y las SUMO E3 ligasas RanBP2 (una nucleoporina acomplejada a su activadora RanGAP1) y PIAS $\gamma$  (Esquema 9) (Dawlaty y col., 2008). Aun habiéndose publicado estudios de localización de algunas de estas proteínas, prácticamente no existen datos de sus distribuciones relativas. Todos estos trabajos se han realizado o bien en mitosis, o bien sobre esparcidos de espermatozoides, pero no existe ningún trabajo que describa cuidadosamente ninguna de estas proteínas reguladoras de Topo II a lo largo de la meiosis de ratón.

Nuestros datos demuestran que RanBP2/RanGAP1 aparecen localizadas en los complejos de poro de las células en profase-I, y que además RanBP2 marca también el cuerpo sexual. Estos resultados concuerdan con publicaciones que apuntan a que el bivalente sexual está sumoilado en paquitena, presumiblemente en relación a los procesos de inactivación del cuerpo sexual (Rogers y col., 2004; Vigodner y Morris, 2005). Sin embargo, no hemos podido detectar ni RanGAP1 ni RanBP2 en los EAs del XY tal y como se ha propuesto previamente en espermatozoides humanos (Vigodner y col., 2006). Tampoco hemos encontrado marcaje de RanGAP1 en los cinetocoros enganchados a MTs tal como se ha visto en cromosomas mitóticos humanos (Joseph y col., 2002). Curiosamente, sí hemos podido observar que en telofase-I y telofase-II, la EN se reconstituye alrededor de los cromosomas. Este patrón de localización concuerda con la identidad de esta proteína como nucleoporina. Ya que se ha descrito que RanBP2/RanGAP1 tienen actividad SUMO E3 ligasa, y que por lo tanto participan en la traslocación de los péptidos SUMO desde UB2I/UBC9 (enzimas SUMOE2) hasta la Topo II, suponemos que su rol como nucleoporinas radica en que son capaces de transportar las SUMOs citosólicas al núcleo para que éstas regulen postranscripcionalmente a Topo II, lo que apoyaría que la presencia de RanBP2 es necesaria para la descarga de moléculas de Topo II sumoiladas a los centrómeros (Dawlaty y col., 2008). No obstante, con nuestros resultados únicamente podemos acotar la función de RanBP2/RanGAP1 al transporte a través de la EN, y no disponemos de evidencias citológicas que impliquen a RanBP2/RanGAP1 en la carga directa de Topo II sumoiladas a los centrómeros.

Tras realizar la inmunodetección de SUMO2/3, hemos encontrado que únicamente se localiza en los cromocentros en profase-I media y tardía, y marcando el cuerpo XY

(imágenes no mostradas). Estos datos concuerdan con lo propuesto previamente en la meiosis de ratón (Rogers y col., 2004; Vigodner y Morris, 2005). Sin embargo, no encontramos marcaje de SUMO2/3 más allá de diacinesis. Esto apunta a que la sumoilación es un importante requisito para la formación y mantenimiento del cuerpo sexual y que probablemente sea un prerrequisito previo a la inactivación del mismo. Ya que se desconocen cuales son las proteínas que son sumoiladas en el XY serán necesarios más estudios que ayuden a clarificar estos procesos.

Desafortunadamente, tras realizar varias pruebas con diferentes anticuerpos no pudimos obtener resultados positivos ni con los anticuerpos contra PIAS $\gamma$  ni con los anticuerpos contra UBC9. Por ello, se plantea realizar en un futuro nuevas inmunolocalizaciones de ambas proteínas cuando se disponga de nuevos anticuerpos con objeto de intentar dilucidar su localización precisa en la meiosis de ratón y sus posibles funciones en relación a la actividad de Topo II.

Por último, es interesante discutir que se ha demostrado en *S. cerevisiae* que Pds5p sumoilada participa en la regulación de la cohesión centromérica durante la mitosis de *S. cerevisiae* (Stead y col., 2003). Existen también datos de RNAi de Pds5 en *X. laevis* en los que se demuestra que tras la inhibición de la actividad de Pds5 se altera la cohesión centromérica en mitosis (Losada y Hirano, 2005). Es importante recordar que nuestros datos demuestran una localización centromérica de PDS5B tanto en la metafase-I como en la metafase-II de ratón. Por lo tanto, proponemos que podría existir un mecanismo dependiente de sumoilación en la meiosis de ratón que incluya las funciones conjuntas de Topo II y PDS5B, el cual sea responsable en parte de la regulación de la cohesión centromérica.

#### **4. La cohesión en los univalentes en metafase-I**

Existen tres posibles causas que tienen como resultado la aparición de univalentes en metafase-I. Una de ellas es la asinapsis durante la profase-I, otra que ocurra desinapsis sin que haya habido recombinación homóloga no recíproca, y por último que se produzca una resolución prematura de la cohesión braquial previa a la metafase-I. En nuestros estudios sobre la cohesión entre cromátidas hermanas hemos analizado el patrón de localización de diferentes proteínas en los univalentes esporádicos que aparecen en las preparaciones de individuos normales de ratón. Con estas observaciones hemos llegado a la conclusión de que los univalentes esporádicos tienen el mismo patrón de distribución de las proteínas implicadas en la cohesión entre cromátidas hermanas que el que existe en los bivalentes. Recientemente se ha descrito el modelo de ratón mutante para la proteína implicada en recombinación RAD51C, en el cual se producen fallos sinápticos durante la meiosis que promueven la aparición de univalentes en metafase-I en machos, y la aparición de cromátidas sueltas en metafase-II en hembras (Kuznetsov y col., 2007), por lo que creímos que sería muy interesante analizar su meiosis. Por este motivo solicitamos al Dr. Shyam K. Sharan del National Cancer Institute en Frederick (EEUU) el envío de ejemplares macho *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>. Ya que la homocigosis para la ausencia del gen que codifica RAD51C provoca la letalidad en estado embrionario, se generaron este tipo de mutantes hipomórficos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> que tienen la proteína RAD51C pero en unos niveles de expresión muy reducidos. Generosamente, nos fueron enviados cuatro ejemplares macho en los que se analizó su comportamiento meiótico.

Pudimos observar un alto porcentaje de espermatocitos en profase-I apoptóticos, lo cual es lógico teniendo en cuenta que la función principal de RAD51C consiste en reparar las roturas de doble cadena de DNA (*DSBs*) a través de la recombinación homóloga (Bennett y Knight, 2005; Kawabata y col., 2005). Estos datos concuerdan con lo publicado por Kuznetsov y col. (2007), en donde se afirma que la mayoría de los espermatocitos en cigotena de los mutantes infértiles *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> quedan bloqueados por la imposibilidad de reparar las *DSBs*. Sin embargo, debido probablemente a la naturaleza hipomórfica de estos mutantes, algunas de las cigotenas con *DSBs* no reparadas consiguen progresar. Aunque se ha propuesto en *A. thaliana* y *D. melanogaster* que RAD51C es la principal responsable de la reparación de *DSBs* en

meiosis (Abdu y col., 2003; Bleuyard y col., 2005; Li y col., 2005), no podemos descartar que en la meiosis de estos ratones mutantes el resto de parálogos de RAD51 (RAD51B, RAD51D, XRCC2, y XRCC3) (Liu y col., 2007) consigan rescatar el fenotipo de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, quizás porque su función sea la misma o porque en ausencia o disminución de RAD51C puedan sintetizarse en mayor cantidad. Aunque existe una publicación sobre la línea DT40 de pollo en la que se afirma que la pérdida de función de los genes codificadores de las proteínas RAD51 no puede ser compensada por la sobreexpresión de ninguna del resto de parálogos (Takata y col., 2001), no existen hasta el momento datos que afirmen que en la meiosis de ratón las funciones de las parálogas de RAD51 no puedan ser complementarias. Además, estos mutantes *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> no tienen afectada la proteína DMC1, la cual es una proteína específicamente meiótica, muy conservada evolutivamente, y cuya función en la reparación de *DSBs* es análoga a la de RAD51C (Bishop y col., 1992; Habu y col., 1996; Pittman y col., 1998).

Aproximadamente la mitad de los espermatoцитos del mutante *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> que han conseguido progresar hasta metafase-I muestran univalentes (Tabla y Gráfico 12). Sin embargo, no hemos observado metafases-I con todos sus cromosomas en estado de univalentes como ocurre en el mutante *Mlh3*<sup>-/-</sup> (Lipkin y col., 2002). No hemos realizado un estudio cuantitativo de la frecuencia de univalentes por metafase-I en nuestras preparaciones debido a las características de la técnica de aplastado. Con esta técnica, los cromosomas en metafase-I mantienen su posición relativa espacial original (Suja y col., 1999), por lo que quedan todos concentrados en la placa ecuatorial en un espacio muy reducido. Generalmente, los univalentes aparecen fuera de la placa en metafase-I, pero no podemos asegurar que tras el aplastado puedan haber quedado univalentes superpuestos en la placa ecuatorial junto al resto de bivalentes alineados que no puedan ser contados con veracidad. Por otro lado, se sabe que la frecuencia de quiasmas disminuye en mutantes para proteínas relacionadas con los procesos de recombinación o reparación de *DSBs* (Jones y Franklin, 2006), pues al haber menos procesos de recombinación o al no repararse correctamente los mismos, respectivamente, la frecuencia de univalentes aumenta. La bajada de la frecuencia de quiasmas implicará también la aparición de más bivalentes monoquiasmáticos y menos biquiasmáticos. En relación a este fenómeno, nosotros hemos observado a grandes rasgos que la mayoría de los bivalentes alineados en placa en *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> son monoquiasmáticos, observándose una frecuencia de bivalentes biquiasmáticos menor a

la observada en individuos normales. No obstante, al igual que para la frecuencia del número de univalentes por metafase-I de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, no hemos procedido a realizar un estudio cuantitativo de la frecuencia del número de quiasmas por célula ya que la técnica de aplastado no puede ofrecernos resultados totalmente fiables. Por otro lado, no hemos observado fragmentos cromosómicos acentroméricos en las metafases-I de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, tal y como aparecen en las preparaciones de esparcido publicadas por Kuznetsov y col. (2007). Lo más probable sería encontrar estos fragmentos fuera de placa, debido a su imposibilidad de alinear, pero no podemos descartar que los posibles fragmentos cromosómicos puedan haber quedado inmersos en la masa de bivalentes alineados en placa. Tampoco podemos asegurar que los univalentes observados fuera de placa tengan la totalidad de sus cromátidas intactas. El hecho de disponer de un número limitado de ejemplares de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, que además poseen los testículos de tamaño muy reducido, ha impedido disponer de material suficiente para llevar a cabo otras técnicas tales como el esparcido después de una fijación con metanol:ácido acético. Debido a que nuestro objetivo principal era analizar el comportamiento de los univalentes durante la primera división meiótica de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> únicamente se procedió a realizar preparaciones de aplastado, pues ésta es la mejor técnica para el estudio de proteínas implicadas en la cohesión de cromátidas hermanas mediante inmunofluorescencia.

Al analizar el comportamiento de las proteínas Topo II, SGOL2, REC8 y SYCP3 junto con los cinetocoros en los univalentes que aparecieron en las metafases-I de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> comprobamos que su patrón de distribución es el mismo que el encontrado en los bivalentes. Por lo tanto, hemos observado el mismo comportamiento para los univalentes esporádicos que para los univalentes de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>. Uno de los resultados más significativos fue observar que en los univalentes en metafase-I de individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, sus cinetocoros hermanos están íntimamente asociados, lo que indica que probablemente llevarán a cabo una orientación sintética. Hemos comprobado que las señales centroméricas de REC8, Topo II y con estructura de “doble cornete” de SGOL2 y SYCP3 son idénticas a las encontradas en los bivalentes. Esta distribución centromérica de REC8, SGOL2 y SYCP3 puede permitir que, tal y como hemos propuesto para los bivalentes, el mantenimiento de la cohesión intercinetocórica se mantenga durante la metafase-I también en los univalentes. Sin embargo, existe una publicación sobre ovocitos de ratón en la que se afirma que los univalentes en metafase-I del mutante *Sycp3*<sup>-/-</sup> orientan sus cinetocoros de manera anfitélica (Kouznetsova y col.,

2007). No obstante, esta publicación no muestra ninguna localización de cohesinas ni de proteínas centroméricas en los univalentes. Por otro lado, la segregación ecuacional de las cromátidas de univalentes en metafase-I también ha sido descrita en ovocitos humanos (Angell y col., 1991; Angell y col., 1994; Hunt y col., 1995). Es importante tener en cuenta que todos los datos sobre orientación anfitélica de univalentes en metafase-I han sido descritos en hembras. El dimorfismo sexual en relación con la flexibilidad de los *checkpoints* meióticos da lugar a fenotipos diferentes para los mutantes de una misma proteína en hembras o en machos, como es el caso de los mutantes *Sycp3*<sup>-/-</sup> (Yuan y col., 2002), y otros como *Mei1*<sup>-/-</sup> (Libby y col., 2002), *Brca*<sup>-/-</sup> (Sharan y col., 2004) o el mismo *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> (Kuznetsov y col., 2007). En estos mutantes, mientras que la meiosis de los machos se bloquea en profase-I o en metafase-I, las hembras tienen un control más laxo sobre los procesos meióticos y pueden completar su meiosis asumiendo la aparición de aberraciones cromosómicas (Hassold y Hunt, 2001). Por este motivo, no podemos descartar que en las hembras mutantes *Sycp3*<sup>-/-</sup> (Kouznetsova y col., 2007), las proteínas implicadas en el SAC lleven a cabo una regulación más flexible que permita la orientación anfitélica de los univalentes en metafase-I, aunque esto suponga el asumir la aparición de aneuploidías. Para analizar el SAC en el mutante *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> hemos inmunolocalizado la proteína de la lámina externa del cinetocoro CENP-E, ya que se ha descrito que marca diferencialmente los cinetocoros de los cromosomas no alineados (Parra y col., 2002). Pudimos comprobar que en los univalentes en metafase-I de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, en los que se imposibilita la biorientación, los cinetocoros asociados presentan una señal de CENP-E mucho más intensa que en el resto de los cinetocoros presentes en los bivalentes alineados. Esto demuestra que en las metafases-I con univalentes de *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> el SAC permanece activado.

También hemos analizado la distribución de Topo II, SGOL2, REC8 y SYCP3 a nivel de brazos. Así, tanto en univalentes como en bivalentes, Topo II marca de manera muy tenue los ejes cromatídicos, y REC8 y SYCP3 adquieren una señal parcheada a lo largo de todo el dominio intercromatídico. Estas observaciones demuestran que, al igual que los bivalentes, los univalentes mantienen sus cromátidas hermanas unidas a lo largo de sus brazos durante la metafase-I. Por lo tanto, éstos datos demuestran indirectamente que la acción de la Separasa no actúa en los brazos cromosómicos durante la metafase-I

(Haering y Nasmyth, 2003), independientemente de si las parejas de homólogos están formando bivalentes o univalentes.

En conjunto, todos nuestros resultados demuestran que la aparición de univalentes en metafase-I de mutantes *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> imposibilita una alineación correcta, y al no poder llevarse a cabo la segregación en anafase-I, se desencadenará muy posiblemente en apoptosis (Mahadevaiah y col., 2000; Eaker y col., 2001). Nosotros observamos que el porcentaje de metafases-I apoptóticas puede llegar a superar el 64% de las metafases-I totales (Tabla y Gráfico 12). Este valor es muy superior a los porcentajes basales de metafases-I apoptóticas en individuos normales. La entrada masiva de metafases-I en apoptosis explica que no hayamos encontrado prácticamente anafases-I, telofases-I ni espermátocitos en segunda división meiótica. Las escasas espermátidas elongadas que hemos encontrado suelen tener morfologías aberrantes, lo cual también es causa en último término de la infertilidad de estos individuos.

Las diferentes recombinasas parálogas de la familia RAD51 intervienen también en la reparación de *DSBs* en mitosis (Mimitou y Symington, 2009). Nuestros resultados demuestran que en los individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> aparecen metafases espermatogoniales bloqueadas, las cuales tienen los cromosomas hipercondensados y mucho más acortados de lo normal, y en las que podemos contar 40 pares de señales cinetocóricas ligeramente más separadas entre sí que en las metafases espermatogoniales normales que aparecen en estos mismos individuos. Con objeto de comprobar si estas metafases eran realmente espermatogonias y no metafases-I con el juego completo de cromosomas en estado de univalentes, realizamos la inmunodetección de la histona H1t, la cual es una variante específicamente meiótica que reemplaza a H1 en testículo y que puede detectarse a partir de paquitena media (Drabent y col., 1996; Inselman y col., 2003). Pudimos comprobar que efectivamente, todas las células meióticas en profase-I a partir de paquitena marcaban intensamente toda su cromatina con H1t, y lo mismo ocurre con las metafases-I. Sin embargo, las metafases espermatogoniales no son detectadas con esta variante de histona, ni tampoco las metafases espermatogoniales bloqueadas. De este modo demostramos que estas células tan particulares son células bloqueadas en metafase mitótica y no metafases-I. Por el momento no podemos dar una explicación a la morfología cromosómica que presentan estas metafases espermatogoniales bloqueadas, y serán necesarios más estudios que intenten esclarecer las causas de su aparición. Lo que sí es interesante discutir es por qué motivo estos individuos

*Rad51c*<sup>ko/neo</sup> son capaces de tener un desarrollo normal si poseen un determinado porcentaje de las mitosis bloqueadas. En primer lugar, hay que aclarar que las aberraciones mitóticas que hemos encontrado han sido observadas en la línea espermatogonial, pero no sabemos si aparecen o no en la línea somática. Puede que en la mitosis de la línea somática, las diferentes parálogas de RAD51 (Liu y col., 2007) sean capaces de atenuar los efectos de la baja expresión de RAD51C en estos mutantes. Además, se ha publicado que la cantidad residual de RAD51C que son capaces de sintetizar los individuos hipomórficos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> es suficiente como para permitir un crecimiento y desarrollo aparentemente normales (Kuznetsov y col., 2007). Sin embargo, en este trabajo no se especifica si, aun siendo normales, estos individuos sufren retrasos en el crecimiento, o si pueden aparecer enfermedades en edad adulta. Tampoco podemos descartar que en la línea somática existan mecanismos de reparación tardía de las *DSBs* llevados a cabo por otras proteínas implicadas en reparación de DNA, y que compensen la baja expresión de RAD51C y permitan por tanto la viabilidad de estos individuos.

Por último, con objeto de analizar más detalladamente las posibles *DSBs* no reparadas tanto en las metafases-I en las que aparecen univalentes como en las espermatogonias bloqueadas en metafase de los individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, decidimos inmunodetectar la variante de histona  $\gamma$ H2AX. Esta histona marca alrededor de unas 50 Kb alrededor de donde se hayan producido las *DSBs* (Lowndes y Toh, 2005). Pudimos observar que en algunas de las metafases-I donde aparecen univalentes y en todas aquellas metafases espermatogoniales bloqueadas se marcaba toda la cromatina con esta histona. Se sabe que las *DSBs* aparecen también en mitosis (Lieber y col., 2004), y puede que al no poder ser reparadas, mantengan un intenso marcaje de  $\gamma$ H2AX en toda la cromatina en las metafases espermatogoniales bloqueadas que observamos en los mutantes *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>. Sin embargo, los efectos sobre la mitosis espermatogonial de la baja expresión de RAD51C en los individuos *Rad51c*<sup>ko/neo</sup> podrán ser pasados puesto que no todas las espermatogonias tienen morfología aberrante, y aquellas que se bloqueen en metafase desencadenarán en apoptosis y consecuentemente no entrarán en meiosis. En este sentido se ha publicado que una única *DSB* no reparada es capaz de inducir apoptosis (Bennett y col., 1993; Huang y col., 1996). No obstante, desconocemos si pueden existir mecanismos de reparación tardía de *DSBs* que puedan recuperar estas metafases espermatogoniales bloqueadas. Asumimos que las



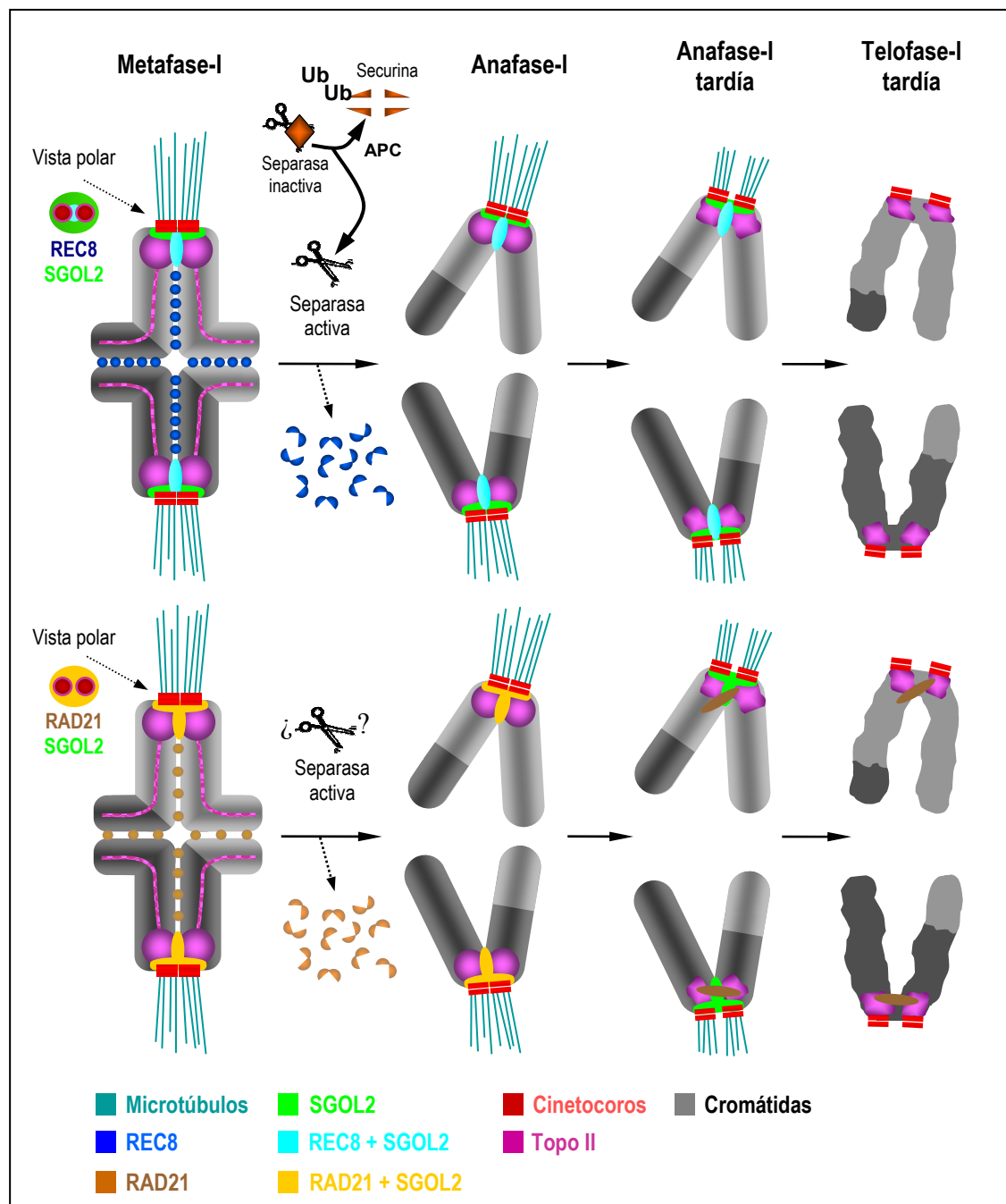
espermatogonias que observamos con una morfología aparentemente normal son las que presumiblemente entrarán en meiosis. Sin embargo, pero ya que estos ratones son deficientes en la proteína RAD51C, la cual juega un importante papel en la reparación del DNA tras la recombinación homóloga en profase-I (Bennett y Knight, 2005; Kawabata y col., 2005), muchas de las dobles roturas masivas que se produzcan previas a la recombinación tampoco podrán ser reparadas. Las profases-I que consigan progresar portando *DSBs* no reparadas avanzarán hasta metafase-I y serán aquellas en las que hemos observado un intenso marcaje de  $\gamma$ H2AX. No obstante, se está especulando recientemente sobre otras funciones de  $\gamma$ H2AX, las cuales determinarían un marcaje más extenso que el de las dobles roturas (Ismail y Hendzel, 2008), por lo que no podemos descartar que el patrón de distribución de  $\gamma$ H2AX tan particular que encontramos en estos mutantes se deba a otras funciones tanto de  $\gamma$ H2AX como de RAD51C que están todavía por determinar.

## **5. Modelo de segregación en la meiosis de ratón**

Con todos los resultados presentados en esta memoria de Tesis Doctoral, podemos elaborar un modelo de segregación cromosómica para la meiosis de machos de ratón. Por supuesto, muchos de los mecanismos moleculares que rigen los procesos esquematizados están aún por determinar, pero hemos diseñado el modelo que más se ajusta a las observaciones citológicas realizadas y que pretende exponer de manera sencilla los fundamentos que rigen los procesos de liberación de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la primera y la segunda división meiótica de machos de ratón.

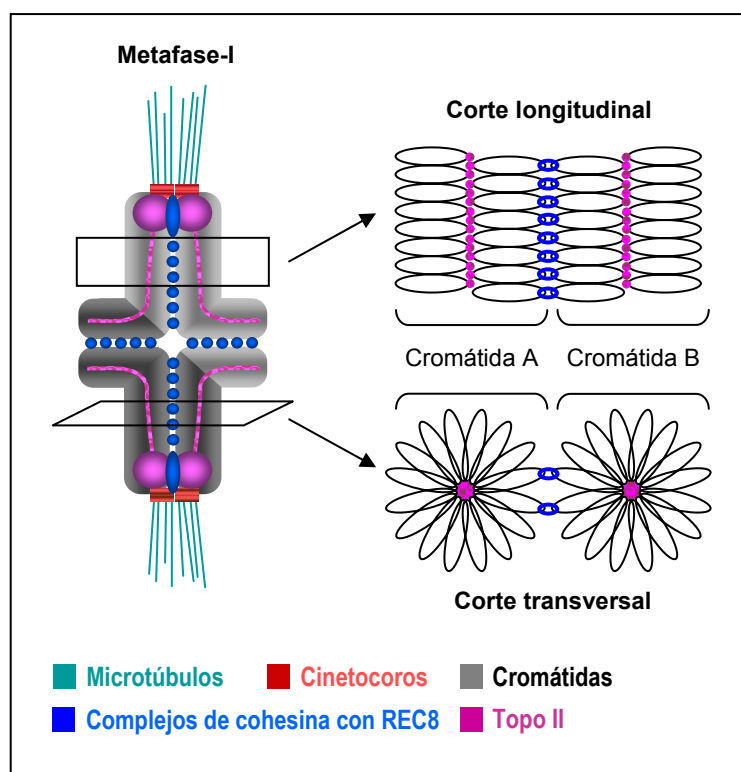
Durante la primera división meiótica (Esquema 20), los diferentes complejos de cohesina se localizan en el dominio intercromatídico (a lo largo de los brazos cromosómicos), y en la región centromérica, para mantener la cohesividad entre las cromátidas hermanas y contribuir a la estructura del bivalente. Con la activación del complejo APC en la transición metafase-I/anafase-I, la Separasa activa corta a la cohesina REC8 permitiendo la apertura de aquellos complejos de cohesina que la contengan y que están localizados en el dominio intercromatídico. No existen evidencias ni nosotros podemos averiguar con nuestra metodología, de si en la transición metafase-I/anafase-I los complejos que contienen RAD21 son liberados de los brazos cromosómicos mediante este mismo proceso. Con la apertura de los anillos de cohesina que mantienen unidas a las cromátidas hermanas a nivel de brazos se produce la pérdida de la cohesión braquial durante la anafase-I provocando la segregación reduccional de los cromosomas homólogos a polos opuestos, con la consecuente reducción a la mitad del número cromosómico. Sin embargo, nuestras observaciones apuntan a que tanto los complejos de cohesina con REC8 como los que contienen RAD21 que se encuentran en la región centromérica están protegidos por SGOL2, la cual impide la acción de la Separasa sobre los complejos de cohesina centroméricos para mantener las cromátidas hermanas unidas por el centrómero hasta la metafase-II. La cohesina RAD21 centromérica mantendría la cohesión intercinetocórica hasta la telofase-I, puesto que únicamente tras su redistribución se produce la individualización de los cinetocoros hermanos. No podemos descartar que REC8 participe también en el mantenimiento de la cohesión intercinetocórica hasta la anafase-I. Además, SGOL2 tiene un importante papel en la resolución tardía de la cohesión

intercinetocórica durante la telofase-I. Por tanto, la acción conjunta de los distintos complejos de cohesina y SGOL2 permite el mantenimiento de la cohesión entre cromátidas hermanas durante la primera división meiótica, y regula la segregación de los cromosomas homólogos recombinados a polos opuestos. La enzima Topo II participa en la estructura cromosómica debido a su localización en los ejes cromatídicos.



**Esquema 20.** Modelo de segregación de cromosomas homólogos durante la primera división meiótica de ratón.

Como último comentario respecto a nuestro modelo de segregación cromosómica durante la primera división meiótica de ratón debemos hacer referencia a la disposición de los anillos de cohesina. Asumiendo que se trata de anillos simples y que la cromatina se distribuye como bucles radiales alrededor de los ejes cromatídicos, los cuales presentan condensinas de tipo I (Viera y col., 2007) y Topo II (Esquema 19), proponemos que los anillos de cohesina se encontrarían abrazando los extremos de los bucles de cromatina provenientes de ambas cromátidas hermanas (Esquema 21). Todos nuestros resultados apoyan este modelo, pues la distribución a nivel de brazos de todas las cohesinas que hemos analizado aparece en la superficie de contacto entre las dos cromátidas hermanas, es decir, en el denominado dominio intercromatídico, y nunca detectamos a las cohesinas a lo largo de los ejes cromatídicos o en la superficie cromosómica (Esquema 20). De este modo, nuestro modelo apoya la idea de que un anillo de cohesina rodea sólo a bucles de cromatina provenientes de ambas cromátidas hermanas (Gruber y col., 2003; Ivanov y Nasmyth, 2005), y sin embargo descarta otros modelos que proponían que los complejos de cohesina podrían abrazar a ambas cromátidas hermanas (Nasmyth, 2001; Haering y Nasmyth, 2003; Lee y col., 2004; Nasmyth, 2005; Kiburz y col., 2008; Sakuno y col., 2009; Sun y col., 2009).



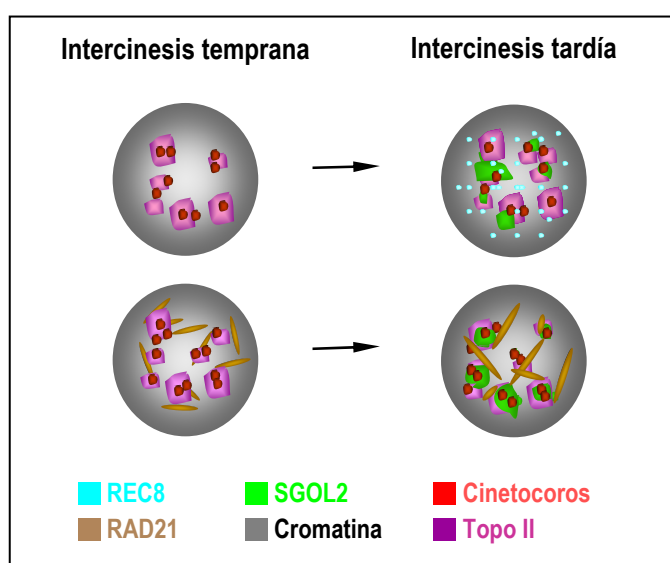
**Esquema 21.** Distribución relativa de los complejos de cohesina con REC8 y los ejes cromatídicos. Se muestra un bivalente en metafase-I del que se representan esquemáticamente un corte longitudinal y un corte transversal donde se observa que los complejos de cohesina abrazan a los extremos de los bucles radiales provenientes de ambas cromátidas hermanas. Este esquema ha sido modificado del original (Viera y col., 2007; Suja y Barbero, 2009). Topo II aparece en la base de los bucles radiales de cromatina.

Durante la intercinesis temprana no observamos marcaje de REC8, pero vuelve a ser detectada en intercinesis tardía. RAD21, la cual había sufrido una importante redistribución en telofase-I, mantiene en intercinesis una estructura a modo de barras en los cromocentros que van desapareciendo poco a poco hasta que no pueden ser detectadas en profase-II. SGOL2, que deja de ser detectada en telofase-I, vuelve a aparecer en los cromocentros en intercinesis tardía. Por el contrario, Topo II no deja nunca de ser detectada en los cromocentros (Esquema 22).

Debido a los pocos datos publicados sobre la localización de proteínas en intercinesis, ésta ha sido una etapa que generalmente se ha pasado por alto en los estudios sobre la meiosis de mamíferos, probablemente por causa de la dificultad de su identificación y análisis. Sin embargo, nosotros consideramos que es una etapa clave en la que se suceden posibles recargas y reorganizaciones de proteínas importantes que posteriormente jugarán un papel esencial en la regulación de la cohesión centromérica durante la segunda división meiótica.

No podemos averiguar con nuestra metodología de dónde proceden las poblaciones de REC8 y SGOL2 que observamos en intercinesis tardía. Una primera opción es que sean a las mismas proteínas que observábamos en la primera división meiótica, que se sueltan de los cromosomas, y que tras su solubilización en el citoplasma vuelven más tarde a reincorporarse a la cromatina. Otra opción podría ser que la recarga de REC8 y SGOL2 sea debida a la síntesis de nuevas proteínas que son importadas desde el citosol y que no habían participado en la primera división meiótica. Ésta hipótesis se justifica por la existencia de datos que confirman la transcripción de proteínas implicadas en el transporte a través de membrana nuclear durante la meiosis de ratón (Anway y col., 2003). No hemos podido comprobar si esta recarga de REC8 y SGOL2 se debe a nueva síntesis, lo que podría ser detectado con novedosas técnicas de detección de RNA FISH que se han desarrollado recientemente (Mahadevaiah y col., 2009). Sin embargo, aunque se ha comprobado mediante diferentes técnicas que gran multitud de genes se transcriben durante la meiosis y la espermiogénesis de ratón (Anway y col., 2003; Pang y col., 2003), hasta el momento sólo se ha demostrado la transcripción de RNA durante la profase-I (Shima y col., 2004; Wang y col., 2005) y en diferentes etapas de maduración de las espermátidas (Schultz y col., 2003), no existiendo ningún dato que demuestre la síntesis proteica *de novo* durante la intercinesis. Por último, podría ser que las proteínas REC8 y SGOL2 que vuelven a ser

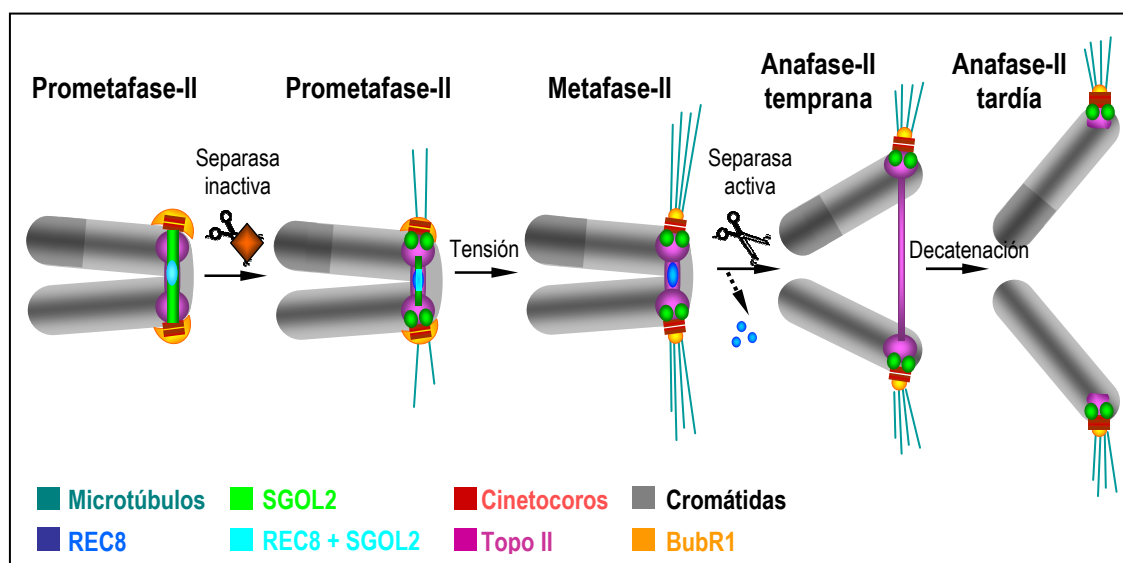
detectadas en intercinesis tardía sean las mismas proteínas que observábamos en la primera división meiótica pero que han sufrido procesos de modificación postranscripcional tales como fosforilación o sumoilación. Debido a estas modificaciones, las proteínas quedarían enmascaradas y es por ello que no podemos detectarlas temporalmente con los anticuerpos utilizados. Teniendo en cuenta que los procesos de modificación postranscripcional de proteínas relacionadas con la cohesión entre cromátidas hermanas en meiosis han sido descritos en varias ocasiones, como es el caso de la fosforilación de cohesinas (Nasmyth y Haering, 2009) o la sumoilación de Topo II (Dawlaty y col., 2008), quizá ésta alternativa sea la más probable.



**Esquema 22.** Modelo de segregación de cromátidas hermanas durante la intercinesis de ratón.

Durante la segunda división meiótica (Esquema 23) se produce una importante redistribución de SGOL2 y Topo II dependiente de tensión que es determinante para permitir la segregación de las cromátidas hermanas recombinadas a polos opuestos. Durante la prometafase-II la Separasa está inactiva y las proteínas SGOL2 y Topo II se localizan en el dominio centromérico interno entre los cinetocoros hermanos. En el momento en que se establece tensión en el centrómero tras el anclaje de MTs a ambos cinetocoros hermanos, se produce una redistribución de SGOL2 que desenmascara los complejos de cohesina con REC8 localizados en la zona central del dominio centromérico interno. Podemos comprobar el momento en el cual se establece tensión mediante la observación de las señales de la quinasa de control de entrada en anafase BubR1. Nuestros resultados no aportan evidencias que expliquen con qué otras

subunidades de cohesina puede estar REC8 formando un complejo de cohesina, puesto que no hemos podido detectar ninguna otra cohesina en los centrómeros de cromosomas en metafase-II. Todas nuestras observaciones citológicas sugieren que la redistribución dependiente de tensión de SGOL2 deja al descubierto a REC8, la cual estaba protegida hasta ese momento, y permite pues la acción de la Separasa. En la transición metafase-II/anafase-II la Separasa corta a las subunidades de REC8 centroméricas y con la liberación de los complejos de cohesina centroméricos se produce el primer paso de la segregación de las cromátidas hermanas en anafase-II temprana. No obstante, las cromátidas hermanas continúan unidas por hebras de cromatina que se marcan con Topo II, y no es hasta que la enzima decatena dichas hebras cuando se produce el segundo y último paso en la separación de las cromátidas hermanas en anafase-II tardía para permitir así la total segregación ecuacional de cromátidas a polos opuestos. Sin embargo, no podemos comprobar con nuestra metodología si las unidades de Topo II que participan en la segregación de las cromátidas hermanas durante la segunda división meiótica son las mismas que tienen un papel esencialmente estructural durante la meiosis-I. Basándonos en que Topo II nunca deja de ser detectada durante toda la meiosis (Esquemas 20, 22 y 23), proponemos que puede que se trate de las mismas proteínas, pero desconocemos si en algún momento determinado han sufrido un procesamiento postranscripcional, probablemente por procesos de sumoilación (Dawlaty y col., 2008), que la haga adquirir durante la meiosis-II roles distintos a los llevados a cabo durante la meiosis-I.



**Esquema 23.** Modelo de segregación de cromátidas hermanas durante la segunda división meiótica de ratón.

---

## ***Conclusiones***







## CONCLUSIONES

El conjunto de los resultados presentados en esta memoria de Tesis Doctoral nos permite establecer las siguientes conclusiones:

1. Durante la meiosis de ratón existen múltiples complejos de cohesinas que regulan diferencialmente la cohesión entre las cromátidas hermanas tanto a nivel de brazos como en el centrómero. Esta conclusión se basa en la coexistencia de las cohesinas REC8 y RAD21, y en el diferente patrón de distribución de RAD21 frente a REC8, SMC3 y STAG3.

2. Durante la profase de la primera división meiótica de ratón se produce una liberación parcial de todas las cohesinas estudiadas de los ELs desinapsados desde diacinesis temprana hasta la prometafase-I. Únicamente la cohesina RAD21 se libera como engrosamientos en los ELs, que posteriormente se liberan en forma de aglomerados citoplasmáticos. Esta disociación parcial de cohesinas podría ser necesaria para permitir la condensación y la resolución de las cromátidas hermanas. Proponemos que los cofactores del complejo de cohesina WAPL y PDS5B, así como la Ciclina A, podrían estar involucrados en este proceso.

3. La Shugoshina SGOL2 tiene varias funciones durante la meiosis de ratón. Durante la primera división meiótica, SGOL2 es la protectora de la cohesión centromérica hasta la anafase-II, y además juega un importante papel en la resolución tardía de la cohesión intercinetocórica durante la telofase-I. Por otro lado, durante la segunda división meiótica, SGOL2 desempeña una función sensora de la tensión entre los cinetocoros hermanos entre la prometafase-II y la anafase-II.

4. La actividad decatenadora del DNA de Topo II entre las cromátidas hermanas en la transición metafase-II/anafase-II es posterior a la liberación de los complejos de cohesina.

5. En los univalentes que aparecen en la primera división meiótica, ya sean espontáneos, o los encontrados en el mutante *Rad51c*<sup>ko/neo</sup>, todas las proteínas implicadas en la cohesión entre cromátidas hermanas que hemos analizado tienen el mismo patrón de distribución que los bivalentes. Estos datos demuestran que los univalentes mantienen sus cromátidas cohesionadas tanto a nivel de centrómero como de brazos, así como la cohesión intercinetocórica. La incapacidad de biorientar de los univalentes de metafase-I mantiene el SAC activado e induce la degeneración de estas células.

6. Hemos elaborado un modelo de segregación cromosómica durante la meiosis de ratón que pone de manifiesto que la cohesión entre las cromátidas hermanas está mediada conjuntamente por distintos complejos de cohesina y por la actividad decatenadora de Topo II.

---

***Material Suplementario***





Se entrega como material suplementario de esta memoria de Tesis Doctoral un DVD en el que se incluyen:

- La memoria en formato pdf.
- *Curriculum Vitae* de Rocío Gómez Lencero en formato pdf.
- Artículos científicos en formato pdf que se han publicado con algunos de los resultados presentados en esta memoria.
- Vídeos en formato avi que han sido citados en los resultados, y a los cuales corresponden las siguientes leyendas:

**Vídeo 1.** Reconstrucción tridimensional de espermátocitos aplastados en diferentes etapas de la profase-I tras la doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (rojo). En cigotena SYCP3 marca los EAs asinapsados y los ELs sinapsados del CS. Los cinetocoros aparecen como pequeñas señales discretas. En paquitena SYCP3 marca los ELs sinapsados de los bivalentes autosómicos y los EAs del bivalente sexual (XY). En diplotena SYCP3 marca los ELs sinapsados y desinapsados de los bivalentes autosómicos y los EAs del bivalente sexual (XY). No se observa marcaje de SYCP3 en la espermátida.

**Vídeo 2.** Reconstrucción tridimensional de la inmunolocalización de los cinetocoros (rojo) y contrateñición de la cromatina con DAPI (azul) sobre los espermátocitos aplastados en profase-I que corresponden al vídeo 1.

**Vídeo 3.** Reconstrucción tridimensional de un espermátocito aplastado en metafase-I tras la doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (rojo). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). SYCP3 aparece como una señal centromérica en forma de “T” bajo cada pareja de cinetocoros hermanos íntimamente asociados, y una señal parcheada a lo largo del dominio intercromatídico.

**Vídeo 4.** Reconstrucción tridimensional de un polo de un espermátocito aplastado en telofase-I tras la doble inmunolocalización de SYCP3 (verde) y de los cinetocoros (rojo). SYCP3 aparece como barras que se localizan entre los cinetocoros hermanos individualizados o ligeramente separadas de los mismos. Se observan aglomerados citoplasmáticos de SYCP3.

**Vídeo 5.** Reconstrucción tridimensional de un espermátocito aplastado en diacinesis tras la doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (rojo). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). REC8 aparece como una señal parcheada a lo largo de los EAs y ELs del CS. Este vídeo corresponde a las imágenes mostradas en la Figura 4 E-F.

**Vídeo 6.** Reconstrucción tridimensional de un espermátocito aplastado en metafase-I tras la doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (rojo). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). REC8 se localiza a lo largo del dominio intercromatídico de todos los bivalentes.

**Vídeo 7.** Reconstrucción tridimensional de dos espermátocitos aplastados en metafase-I y anafase-I tardía tras la doble inmunolocalización de REC8 (verde) y de los cinetocoros (rojo). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). En metafase-I REC8 se localiza a lo largo del dominio intercromatídico de todos los bivalentes. En anafase-I tardía REC8 persiste en los centrómeros como señales en forma de coma.

**Vídeo 8.** Reconstrucción tridimensional de espermátocitos aplastados en diferentes etapas de la profase-I tras la doble inmunolocalización de REC8-*myc* (verde) y RAD21 (rojo). La cromatina se ha contrateñido con DAPI (azul). En leptotena REC8 y RAD21 marcan los EAs. Se observan además acúmulos de RAD21 en los nucleolos, los cuales no se marcan con REC8. En cigotena REC8 y RAD21 colocalizan totalmente en los EAs asinapsados y en los ELs sinapsados. En paquitena REC8 y RAD21 colocalizan totalmente marcando los ELs sinapsados.

**Vídeo 9.** Reconstrucción tridimensional de un espermátocito aplastado en metafase-II tras la doble inmunolocalización de Topo II (verde) y de los cinetocoros (rojo). Topo II marca unas intensas barras entre los cinetocoros hermanos de todos los cromosomas. Este vídeo corresponde a las imágenes mostradas en la Figura 46 K-L.

**Vídeo 10.** Secuencia de los distintos planos focales de un espermátocito aplastado en anafase-II temprana tras la inmunolocalización de Topo II (verde) y contratinción con DAPI (azul). Topo II aparece como unas delgadas hebras que conectan los cinetocoros hermanos.

---

## ***Bibliografia***







- Abdu, U., Gonzalez-Reyes, A., Ghabrial, A. and Schupbach, T.** (2003). The *Drosophila* spn-D gene encodes a RAD51C-like protein that is required exclusively during meiosis. *Genetics* **165**, 197-204.
- Adams, R. R., Maiato, H., Earnshaw, W. C. and Carmena, M.** (2001). Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J Cell Biol* **153**, 865-80.
- Aguilar, C., Davidson, C., Dix, M., Stead, K., Zheng, K., Hartman, T. and Guacci, V.** (2005). Topoisomerase II suppresses the temperature sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* pds5 mutants, but not the defect in sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* **4**, 1294-304.
- Akimitsu, N., Kamura, K., Tone, S., Sakaguchi, A., Kikuchi, A., Hamamoto, H. and Sekimizu, K.** (2003). Induction of apoptosis by depletion of DNA topoisomerase II $\alpha$  in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 301-7.
- Albini, S. M. and Jones, G. H.** (1987). Synaptonemal complex spreading in *Allium cepa* and *A. fistulosum*. The initiation and sequence of pairing. *Chromosoma* **95**, 324-38.
- Alexandru, G., Uhlmann, F., Mechtler, K., Poupard, M. A. and Nasmyth, K.** (2001). Phosphorylation of the cohesin subunit Scc1 by Polo/Cdc5 kinase regulates sister chromatid separation in yeast. *Cell* **105**, 459-72.
- Alzheimer, M. and Benavente, R.** (1996). Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res* **228**, 181-8.
- Allshire, R. C.** (1997). Centromeres, checkpoints and chromatid cohesion. *Curr Opin Genet Dev* **7**, 264-73.
- Anderson, D. E., Losada, A., Erickson, H. P. and Hirano, T.** (2002). Condensin and cohesin display different arm conformations with characteristic hinge angles. *J Cell Biol* **156**, 419-24.
- Anderson, R. D. and Berger, N. A.** (1994). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat Res* **309**, 109-42.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L. and Swedlow, J. R.** (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Dev Cell* **6**, 253-68.
- Angell, R. R.** (1995). Meiosis I in human oocytes. *Cytogenet Cell Genet* **69**, 266-72.
- Angell, R. R., Xian, J., Keith, J., Ledger, W. and Baird, D. T.** (1994). First meiotic division abnormalities in human oocytes: mechanism of trisomy formation. *Cytogenet Cell Genet* **65**, 194-202.
- Angell, W. W., Pupello, D. F., Bessone, L. N., Hiro, S. P. and Brock, J. C.** (1991). Effect of stent mounting on tissue valves for aortic valve replacement. *J Card Surg* **6**, 595-9.
- Anway, M. D., Li, Y., Ravindranath, N., Dym, M. and Griswold, M. D.** (2003). Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. *J Androl* **24**, 173-84.
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C. H., Mechtler, K. and Nasmyth, K.** (2003). ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol* **13**, 1941-53.
- Aslanukov, A., Bhowmick, R., Guraju, M., Oswald, J., Raz, D., Bush, R. A., Sieving, P. A., Lu, X., Bock, C. B. and Ferreira, P. A.** (2006). RanBP2 modulates Cox11 and hexokinase I activities and haploinsufficiency of RanBP2 causes deficits in glucose metabolism. *PLoS Genet* **2**, e177.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A., Anan, T. and Dasso, M.** (2005). PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes. *Embo J* **24**, 2172-82.
- Azuma, Y., Arnaoutov, A. and Dasso, M.** (2003). SUMO-2/3 regulates topoisomerase II in mitosis. *J Cell Biol* **163**, 477-87.

- Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N. and Elledge, S. J.** (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* **9**, 1169-82.
- Bannister, L. A., Reinholdt, L. G., Munroe, R. J. and Schimenti, J. C.** (2004). Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin Rec8. *Genesis* **40**, 184-94.
- Barbero, J. L.** (2009). Cohesins: chromatin architects in chromosome segregation, control of gene expression and much more. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2025-35.
- Baumann, C., Korner, R., Hofmann, K. and Nigg, E. A.** (2007). PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* **128**, 101-14.
- Bausch, C., Noone, S., Henry, J. M., Gaudenz, K., Sanderson, B., Seidel, C. and Gerton, J. L.** (2007). Transcription alters chromosomal locations of cohesin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**, 8522-32.
- Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M. and Dym, M.** (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* **74**, 68-85.
- Ben-Shahar, T. R., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M. and Uhlmann, F.** (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* **321**, 563-6.
- Bennett, B. T. and Knight, K. L.** (2005). Cellular localization of human Rad51C and regulation of ubiquitin-mediated proteolysis of Rad51. *J Cell Biochem* **96**, 1095-109.
- Bennett, C. B., Lewis, A. L., Baldwin, K. K. and Resnick, M. A.** (1993). Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5613-7.
- Bernard, P., Schmidt, C. K., Vaur, S., Dheur, S., Drogat, J., Genier, S., Ekwall, K., Uhlmann, F. and Javerzat, J. P.** (2008). Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *Embo J* **27**, 111-21.
- Bickel, S. E., Moore, D. P., Lai, C. and Orr-Weaver, T. L.** (1998). Genetic interactions between mei-S332 and ord in the control of sister-chromatid cohesion. *Genetics* **150**, 1467-76.
- Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N.** (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439-56.
- Blat, Y. and Kleckner, N.** (1999). Cohesins bind to preferential sites along yeast chromosome III, with differential regulation along arms versus the centric region. *Cell* **98**, 249-59.
- Bleuyard, J. Y., Gallego, M. E., Savigny, F. and White, C. I.** (2005). Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *Plant J* **41**, 533-45.
- Bolcun-Filas, E., Speed, R., Taggart, M., Grey, C., de Massy, B., Benavente, R. and Cooke, H. J.** (2009). Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet* **5**, e1000393.
- Brar, G. A., Hochwagen, A., Ee, L. S. and Amon, A.** (2009). The multiple roles of cohesin in meiotic chromosome morphogenesis and pairing. *Mol Biol Cell* **20**, 1030-47.
- Brar, G. A., Kiburz, B. M., Zhang, Y., Kim, J. E., White, F. and Amon, A.** (2006). Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature* **441**, 532-6.
- Buonomo, S. B., Clyne, R. K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F. and Nasmyth, K.** (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* **103**, 387-98.

- Cai, X., Dong, F., Edelman, R. E. and Makaroff, C. A.** (2003). The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *J Cell Sci* **116**, 2999-3007.
- Campbell, J. L. and Cohen-Fix, O.** (2002). Chromosome cohesion: ring around the sisters? *Trends Biochem Sci* **27**, 492-5.
- Carpenter, A. J. and Porter, A. C.** (2004). Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase II $\alpha$  mutant human cell line. *Mol Biol Cell* **15**, 5700-11.
- Castano, I. B., Brzoska, P. M., Sadoff, B. U., Chen, H. and Christman, M. F.** (1996). Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**, 2564-76.
- Ciosk, R., Shirayama, M., Shevchenko, A., Tanaka, T., Toth, A., Shevchenko, A. and Nasmyth, K.** (2000). Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scc2 and Scc4 proteins. *Mol Cell* **5**, 243-54.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M. and Nasmyth, K.** (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067-76.
- Clarke, A. S., Tang, T. T., Ooi, D. L. and Orr-Weaver, T. L.** (2005). POLO kinase regulates the *Drosophila* centromere cohesion protein MEI-S332. *Dev Cell* **8**, 53-64.
- Clarke, D. J., Johnson, R. T. and Downes, C. S.** (1993). Topoisomerase II inhibition prevents anaphase chromatid segregation in mammalian cells independently of the generation of DNA strand breaks. *J Cell Sci* **105** (Pt 2), 563-9.
- Cobb, J., Cargile, B. and Handel, M. A.** (1999a). Acquisition of competence to condense metaphase I chromosomes during spermatogenesis. *Dev Biol* **205**, 49-64.
- Cobb, J. and Handel, M. A.** (1998). Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 445-50.
- Cobb, J., Miyaike, M., Kikuchi, A. and Handel, M. A.** (1999b). Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II  $\alpha$  localization and chromosome condensation. *Chromosoma* **108**, 412-25.
- Cobb, J., Reddy, R. K., Park, C. and Handel, M. A.** (1997). Analysis of expression and function of topoisomerase I and II during meiosis in male mice. *Mol Reprod Dev* **46**, 489-98.
- Coelho, P. A., Queiroz-Machado, J. and Sunkel, C. E.** (2003). Condensin-dependent localisation of topoisomerase II to an axial chromosomal structure is required for sister chromatid resolution during mitosis. *J Cell Sci* **116**, 4763-76.
- Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W. and Koshland, D.** (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev* **10**, 3081-93.
- Collins, I. and Newlon, C. S.** (1994). Chromosomal DNA replication initiates at the same origins in meiosis and mitosis. *Mol Cell Biol* **14**, 3524-34.
- Comings, D. E.** (1966). Centromere: absence of DNA replication during chromatid separation in human fibroblasts. *Science* **154**, 1463-4.
- Cooke, C. A., Heck, M. M. and Earnshaw, W. C.** (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* **105**, 2053-67.
- Cooke, C. A., Schaar, B., Yen, T. J. and Earnshaw, W. C.** (1997). Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase. *Chromosoma* **106**, 446-55.
- Costa, Y., Speed, R. M., Gautier, P., Semple, C. A., Maratou, K., Turner, J. M. and Cooke, H. J.** (2006). Mouse MAELSTROM: the link between meiotic silencing of unsynapsed chromatin and microRNA pathway? *Hum Mol Genet* **15**, 2324-2334.
- Crossen, P. E., Pathak, S. and Arrighi, F. E.** (1975). A high resolution study of the DNA replication patterns of chinese hamster chromosomes using sister chromatid differential staining technique. *Chromosoma* **52**, 339-47.

- Chaly, N., Chen, X., Dentry, J. and Brown, D. L.** (1996). Organization of DNA topoisomerase II isotypes during the cell cycle of human lymphocytes and HeLa cells. *Chromosome Res* **4**, 457-66.
- Champoux, J. J.** (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**, 369-413.
- Chan, G. K., Jablonski, S. A., Sudakin, V., Hittle, J. C. and Yen, T. J.** (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* **146**, 941-54.
- Chan, G. K., Schaar, B. T. and Yen, T. J.** (1998). Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J Cell Biol* **143**, 49-63.
- Chang, C. J., Goulding, S., Earnshaw, W. C. and Carmena, M.** (2003). RNAi analysis reveals an unexpected role for topoisomerase II in chromosome arm congression to a metaphase plate. *J Cell Sci* **116**, 4715-26.
- Chelysheva, L., Diallo, S., Vezon, D., Gendrot, G., Vrielynck, N., Belcram, K., Rocques, N., Márquez-Lema, A., Bhatt, A. M., Horlow, C. et al.** (2005). AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J Cell Sci* **118**, 4621-32.
- Christensen, M. O., Larsen, M. K., Barthelmes, H. U., Hock, R., Andersen, C. L., Kjeldsen, E., Knudsen, B. R., Westergaard, O., Boege, F. and Mielke, C.** (2002). Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* **157**, 31-44.
- Dai, J. and Higgins, J. M.** (2005). Haspin: a mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle* **4**, 665-8.
- Dai, J., Sullivan, B. A. and Higgins, J. M.** (2006). Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev Cell* **11**, 741-50.
- Darlington, C. D.** (1932). Recent Advances in Cytology. London: Churchill.
- Darwiche, N., Freeman, L. A. and Strunnikov, A.** (1999). Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* **233**, 39-47.
- Dawlaty, M. M., Malureanu, L., Jeganathan, K. B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R. and van Deursen, J. M.** (2008). Resolution of sister centromeres requires RanBP2-mediated SUMOylation of topoisomerase IIalpha. *Cell* **133**, 103-15.
- de Carvalho, C. E. and Colaiacovo, M. P.** (2006). SUMO-mediated regulation of synaptonemal complex formation during meiosis. *Genes Dev* **20**, 1986-92.
- de Rooij, D. G. and de Boer, P.** (2003). Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet Genome Res* **103**, 267-76.
- Deardorff, M. A., Kaur, M., Yaeger, D., Rampuria, A., Korolev, S., Pie, J., Gil-Rodríguez, C., Arnedo, M., Loeys, B., Kline, A. D. et al.** (2007). Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *Am J Hum Genet* **80**, 485-94.
- del Cerro, A. L., Jones, G. H. and Santos, J. L.** (1997). Chiasma localization and incomplete synapsis in two species of Tetrigidae (Orthoptera). *Chromosome Res* **5**, 69-71.
- Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K. and Tanaka, T. U.** (2004). Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* **428**, 93-7.
- Díaz-Martínez, L. A., Giménez-Abián, J. F., Azuma, Y., Guacci, V., Giménez-Martín, G., Lanier, L. M. and Clarke, D. J.** (2006). PIASgamma is required for faithful chromosome segregation in human cells. *PLoS ONE* **1**, e53.
- Díaz-Martínez, L. A., Giménez-Abián, J. F. and Clarke, D. J.** (2007). Regulation of centromeric cohesion by sororin independently of the APC/C. *Cell Cycle* **6**, 714-24.
- DiNardo, S., Voelkel, K. and Sternglanz, R.** (1984). DNA topoisomerase II mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2616-20.
- Dobson, M. J., Pearlman, R. E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B. and Moens, P. B.** (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* **107** ( Pt 10), 2749-2760.

- Dorsett, D.** (2007). Roles of the sister chromatid cohesion apparatus in gene expression, development, and human syndromes. *Chromosoma* **116**, 1-13.
- Dorsett, D., Eissenberg, J. C., Misulovin, Z., Martens, A., Redding, B. and McKim, K.** (2005). Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in *Drosophila*. *Development* **132**, 4743-53.
- Dorsett, D. and Krantz, I. D.** (2009). On the molecular etiology of Cornelia de Lange syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1151**, 22-37.
- Downes, C. S., Mullinger, A. M. and Johnson, R. T.** (1991). Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8895-9.
- Eaker, S., Pyle, A., Cobb, J. and Handel, M. A.** (2001). Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* **114**, 2953-65.
- Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. and Liu, L. F.** (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* **100**, 1706-15.
- Earnshaw, W. C. and Heck, M. M.** (1985). Localization of topoisomerase II in mitotic chromosomes. *J Cell Biol* **100**, 1716-25.
- Eckley, D. M., Ainsztein, A. M., Mackay, A. M., Goldberg, I. G. and Earnshaw, W. C.** (1997). Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells. *J Cell Biol* **136**, 1169-83.
- Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. and Jessberger, R.** (2000). Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* **113** ( Pt 4), 673-82.
- Eijpe, M., Offenberg, H., Jessberger, R., Revenkova, E. and Heyting, C.** (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* **160**, 657-70.
- Esponda, P. and Giménez-Martín, G.** (1972). The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma* **38**, 405-17.
- Fang, G., Yu, H. and Kirschner, M. W.** (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* **12**, 1871-83.
- Farmer, J. B. and Moore, J. E. S.** (1905). On the meiotic phase (reduction divisions) in animals and plants. . *Quarterly Journal of Microscopical Science* **48**, 489-557.
- Fawcett, D. W.** (1956). The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 403-6.
- Ferguson, L. R. and Baguley, B. C.** (1994). Topoisomerase II enzymes and mutagenicity. *Environ Mol Mutagen* **24**, 245-61.
- Firooznia, A., Revenkova, E. and Jessberger, R.** (2005). From the XXVII North American Testis Workshop: the function of SMC and other cohesin proteins in meiosis. *J Androl* **26**, 1-10.
- Fortune, J. M. and Osheroff, N.** (1998). Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage. *J Biol Chem* **273**, 17643-50.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T. and Yanagida, M.** (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381**, 438-41.
- Gandhi, R., Gillespie, P. J. and Hirano, T.** (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol* **16**, 2406-17.
- Gause, M., Webber, H. A., Misulovin, Z., Haller, G., Rollins, R. A., Eissenberg, J. C., Bickel, S. E. and Dorsett, D.** (2008). Functional links between *Drosophila* Nipped-B and cohesin in somatic and meiotic cells. *Chromosoma* **117**, 51-66.

**Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J. M. and Ellenberg, J.** (2006). Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr Biol* **16**, 1571-8.

**Gill, G.** (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**, 2046-59.

**Gillespie, P. J. and Hirano, T.** (2004). Scc2 couples replication licensing to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol* **14**, 1598-603.

**Gilliland, W. D. and Hawley, R. S.** (2005). Cohesin and the maternal age effect. *Cell* **123**, 371-3.

**Giménez-Abián, J. F., Sumara, I., Hirota, T., Hauf, S., Gerlich, D., de la Torre, C., Ellenberg, J. and Peters, J. M.** (2004). Regulation of sister chromatid cohesion between chromosome arms. *Curr Biol* **14**, 1187-93.

**Glynn, E. F., Megee, P. C., Yu, H. G., Mistrot, C., Unal, E., Koshland, D. E., DeRisi, J. L. and Gerton, J. L.** (2004). Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biol* **2**, E259.

**Gómez, R., Valdeolillos, A., Parra, M. T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J. S., Barbero, J. L. and Suja, J. A.** (2007). Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep* **8**, 173-80.

**Gorbsky, G. J., Chen, R. H. and Murray, A. W.** (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol* **141**, 1193-205.

**Gorr, I. H., Boos, D. and Stemmann, O.** (2005). Mutual inhibition of separase and Cdk1 by two-step complex formation. *Mol Cell* **19**, 135-41.

**Gregson, H. C., Schmiesing, J. A., Kim, J. S., Kobayashi, T., Zhou, S. and Yokomori, K.** (2001). A potential role for human cohesin in mitotic spindle aster assembly. *J Biol Chem* **276**, 47575-82.

**Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K. and Nasmyth, K.** (2006). Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* **127**, 523-37.

**Gruber, S., Haering, C. H. and Nasmyth, K.** (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**, 765-77.

**Grue, P., Grasser, A., Sehested, M., Jensen, P. B., Uhse, A., Straub, T., Ness, W. and Boege, F.** (1998). Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIalpha are not adopted by topoisomerase IIbeta in human H69 cells. *J Biol Chem* **273**, 33660-6.

**Guacci, V.** (2007). Sister chromatid cohesion: the cohesin cleavage model does not ring true. *Genes Cells* **12**, 693-708.

**Guacci, V., Koshland, D. and Strunnikov, A.** (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47-57.

**Habu, T., Taki, T., West, A., Nishimune, Y. and Morita, T.** (1996). The mouse and human homologs of DMCL1, the yeast meiosis-specific homologous recombination gene, have a common unique form of exon-skipped transcript in meiosis. *Nucleic Acids Res* **24**, 470-7.

**Haering, C. H., Lowe, J., Hochwagen, A. and Nasmyth, K.** (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* **9**, 773-88.

**Haering, C. H. and Nasmyth, K.** (2003). Building and breaking bridges between sister chromatids. *Bioessays* **25**, 1178-91.

**Haering, C. H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K. and Lowe, J.** (2004). Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell* **15**, 951-64.

**Hamant, O., Golubovskaya, I., Meeley, R., Fiume, E., Timofejeva, L., Schleiffer, A., Nasmyth, K. and Cande, W. Z.** (2005). A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Curr Biol* **15**, 948-54.

- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R. and Hoog, C.** (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* **119**, 4025-32.
- Hartman, T., Stead, K., Koshland, D. and Guacci, V.** (2000). Pds5p is an essential chromosomal protein required for both sister chromatid cohesion and condensation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **151**, 613-26.
- Hassold, T. and Hunt, P.** (2001). To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* **2**, 280-91.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C. M., Mechtler, K. and Peters, J. M.** (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biol* **3**, e69.
- Hauf, S., Waizenegger, I. C. and Peters, J. M.** (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* **293**, 1320-3.
- Heyting, C.** (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 389-396.
- Hirano, M. and Hirano, T.** (2006). Opening closed arms: long-distance activation of SMC ATPase by hinge-DNA interactions. *Mol Cell* **21**, 175-86.
- Hirano, T.** (2005). Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr Biol* **15**, R265-75.
- Hirano, T. and Mitchison, T. J.** (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* **79**, 449-58.
- Hodges, C. A., Revenkova, E., Jessberger, R., Hassold, T. J. and Hunt, P. A.** (2005). SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* **37**, 1351-5.
- Holm, C., Goto, T., Wang, J. C. and Botstein, D.** (1985). DNA topoisomerase II is required at the time of mitosis in yeast. *Cell* **41**, 553-63.
- Holloway, S. L.** (1995). Sister chromatid separation in vivo and in vitro. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 243-8.
- Hooker, G. W. and Roeder, G. S.** (2006). A Role for SUMO in meiotic chromosome synapsis. *Curr Biol* **16**, 1238-43.
- Hornig, N. C., Knowles, P. P., McDonald, N. Q. and Uhlmann, F.** (2002). The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol* **12**, 973-82.
- Hornig, N. C. and Uhlmann, F.** (2004). Preferential cleavage of chromatin-bound cohesin after targeted phosphorylation by Polo-like kinase. *Embo J* **23**, 3144-53.
- Hou, F. and Zou, H.** (2005). Two human orthologues of Eco1/Ctf7 acetyltransferases are both required for proper sister-chromatid cohesion. *Mol Biol Cell* **16**, 3908-18.
- Huang, H., Feng, J., Famulski, J., Rattner, J. B., Liu, S. T., Kao, G. D., Muschel, R., Chan, G. K. and Yen, T. J.** (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *J Cell Biol* **177**, 413-24.
- Huang, K. C., Gao, H., Yamasaki, E. F., Grabowski, D. R., Liu, S., Shen, L. L., Chan, K. K., Ganapathi, R. and Snapka, R. M.** (2001). Topoisomerase II poisoning by ICRF-193. *J Biol Chem* **276**, 44488-94.
- Huang, L. C., Clarkin, K. C. and Wahl, G. M.** (1996). Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4827-32.
- Huang, X., Andreu-Vieyra, C. V., York, J. P., Hatcher, R., Lu, T., Matzuk, M. M. and Zhang, P.** (2008). Inhibitory phosphorylation of separase is essential for genome stability and viability of murine embryonic germ cells. *PLoS Biol* **6**, e15.
- Huang, X., Hatcher, R., York, J. P. and Zhang, P.** (2005). Securin and separase phosphorylation act redundantly to maintain sister chromatid cohesion in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **16**, 4725-32.
- Hunt, P., LeMaire, R., Embury, P., Sheean, L. and Mroz, K.** (1995). Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. *Hum Mol Genet* **4**, 2007-12.



- Indjeian, V. B., Stern, B. M. and Murray, A. W.** (2005). The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* **307**, 130-3.
- Ishida, R., Iwai, M., Marsh, K. L., Austin, C. A., Yano, T., Shibata, M., Nozaki, N. and Hara, A.** (1996). Threonine 1342 in human topoisomerase II $\alpha$  is phosphorylated throughout the cell cycle. *J Biol Chem* **271**, 30077-82.
- Ismail, I. H. and Hendzel, M. J.** (2008). The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen* **49**, 73-82.
- Ivanov, D. and Nasmyth, K.** (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* **122**, 849-60.
- John, B.** (1990). Meiosis. Cambridge: Cambridge University Press.
- Johnson, E. S.** (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82.
- Johnson, V. L., Scott, M. I., Holt, S. V., Hussein, D. and Taylor, S. S.** (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J Cell Sci* **117**, 1577-89.
- Jones, G. H. and Franklin, F. C.** (2006). Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* **126**, 246-8.
- Joseph, J., Liu, S. T., Jablonski, S. A., Yen, T. J. and Dasso, M.** (2004). The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol* **14**, 611-7.
- Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G. and Dasso, M.** (2002). SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol* **156**, 595-602.
- Kalitsis, P., Griffiths, B. and Choo, K. H.** (2006). Mouse telocentric sequences reveal a high rate of homogenization and possible role in Robertsonian translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8786-91.
- Kallio, M. and Lahdetie, J.** (1993). Analysis of micronuclei induced in mouse early spermatids by mitomycin C, vinblastine sulfate or etoposide using fluorescence in situ hybridization. *Mutagenesis* **8**, 561-7.
- Kallio, M. and Lahdetie, J.** (1996). Fragmentation of centromeric DNA and prevention of homologous chromosome separation in male mouse meiosis in vivo by the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Mutagenesis* **11**, 435-43.
- Kallio, M. and Lahdetie, J.** (1997). Effects of the DNA topoisomerase II inhibitor merbarone in male mouse meiotic divisions in vivo: cell cycle arrest and induction of aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* **29**, 16-27.
- Kateneva, A. V., Konovchenko, A. A., Guacci, V. and Dresser, M. E.** (2005). Recombination protein Tid1p controls resolution of cohesin-dependent linkages in meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **171**, 241-53.
- Katis, V. L., Galova, M., Rabitsch, K. P., Gregan, J. and Nasmyth, K.** (2004a). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr Biol* **14**, 560-72.
- Katis, V. L., Matos, J., Mori, S., Shirahige, K., Zachariae, W. and Nasmyth, K.** (2004b). Spo13 facilitates monopolin recruitment to kinetochores and regulates maintenance of centromeric cohesion during yeast meiosis. *Curr Biol* **14**, 2183-96.
- Kawabata, M., Kawabata, T. and Nishibori, M.** (2005). Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med Okayama* **59**, 1-9.
- Kenna, M. A. and Skibbens, R. V.** (2003). Mechanical link between cohesion establishment and DNA replication: Ctf7p/Eco1p, a cohesion establishment factor, associates with three different replication factor C complexes. *Mol Cell Biol* **23**, 2999-3007.
- Kerrebrock, A. W., Moore, D. P., Wu, J. S. and Orr-Weaver, T. L.** (1995). Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell* **83**, 247-56.
- Kiburz, B. M., Amon, A. and Marston, A. L.** (2008). Shugoshin promotes sister kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **19**, 1199-209.

- Kim, Y., Heuser, J. E., Waterman, C. M. and Cleveland, D. W.** (2008). CENP-E combines a slow, processive motor and a flexible coiled coil to produce an essential motile kinetochore tether. *J Cell Biol* **181**, 411-9.
- Kimura, K., Nozaki, N., Enomoto, T., Tanaka, M. and Kikuchi, A.** (1996). Analysis of M phase-specific phosphorylation of DNA topoisomerase II. *J Biol Chem* **271**, 21439-45.
- Kitajima, T. S., Hauf, S., Ohsugi, M., Yamamoto, T. and Watanabe, Y.** (2005). Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol* **15**, 353-9.
- Kitajima, T. S., Kawashima, S. A. and Watanabe, Y.** (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**, 510-7.
- Kitajima, T. S., Miyazaki, Y., Yamamoto, M. and Watanabe, Y.** (2003a). Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *Embo J* **22**, 5643-53.
- Kitajima, T. S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S. A. and Watanabe, Y.** (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441**, 46-52.
- Kitajima, T. S., Yokobayashi, S., Yamamoto, M. and Watanabe, Y.** (2003b). Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science* **300**, 1152-5.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Bonomo, S. B., Michaelis, C., Nairz, K. and Nasmyth, K.** (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**, 91-103.
- Koshland, D. and Hartwell, L. H.** (1987). The structure of sister minichromosome DNA before anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **238**, 1713-6.
- Kouznetsova, A., Lister, L., Nordenskjold, M., Herbert, M. and Hoog, C.** (2007). Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nat Genet* **39**, 966-8.
- Kouznetsova, A., Novak, I., Jessberger, R. and Hoog, C.** (2005). SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *J Cell Sci* **118**, 2271-8.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R. et al.** (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**, 3-11.
- Kudo, N. R., Anger, M., Peters, A. H., Stemmann, O., Theussl, H. C., Helmhart, W., Kudo, H., Heyting, C. and Nasmyth, K.** (2009). Role of cleavage by separase of the Rec8 kleisin subunit of cohesin during mammalian meiosis I. *J Cell Sci* **122**, 2686-98.
- Kudo, N. R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K. G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B. et al.** (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* **126**, 135-46.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B. H., Lipp, J. J., Schleiffer, A., Mechtler, K. and Peters, J. M.** (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* **127**, 955-67.
- Kumada, K., Yao, R., Kawaguchi, T., Karasawa, M., Hoshikawa, Y., Ichikawa, K., Sugitani, Y., Imoto, I., Inazawa, J., Sugawara, M. et al.** (2006). The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol* **172**, 835-46.
- Kuroda, M., Oikawa, K., Ohbayashi, T., Yoshida, K., Yamada, K., Mimura, J., Matsuda, Y., Fujii-Kuriyama, Y. and Mukai, K.** (2005). A dioxin sensitive gene, mammalian WAPL, is implicated in spermatogenesis. *FEBS Lett* **579**, 167-72.
- Kuznetsov, S., Pellegrini, M., Shuda, K., Fernández-Capetillo, O., Liu, Y., Martín, B. K., Burkett, S., Southon, E., Pati, D., Tessarollo, L. et al.** (2007). RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Biol* **176**, 581-92.

- La Salle, S., Sun, F., Zhang, X. D., Matunis, M. J. and Handel, M. A.** (2008). Developmental control of sumoylation pathway proteins in mouse male germ cells. *Dev Biol* **321**, 227-37.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lammers, J. H., Offenberg, H. H., van Aalderen, M., Vink, A. C., Dietrich, A. J. and Heyting, C.** (1994). The gene encoding a major component of the lateral elements of synaptonemal complexes of the rat is related to X-linked lymphocyte-regulated genes. *Mol Cell Biol* **14**, 1137-46.
- Lavoie, B. D., Hogan, E. and Koshland, D.** (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J Cell Biol* **156**, 805-15.
- LeBlanc, H. N., Tang, T. T., Wu, J. S. and Orr-Weaver, T. L.** (1999). The mitotic centromeric protein MEI-S332 and its role in sister-chromatid cohesion. *Chromosoma* **108**, 401-11.
- Lee, B. H., Amon, A. and Prinz, S.** (2002). Spo13 regulates cohesin cleavage. *Genes Dev* **16**, 1672-81.
- Lee, B. H., Kiburz, B. M. and Amon, A.** (2004). Spo13 maintains centromeric cohesion and kinetochore coorientation during meiosis I. *Curr Biol* **14**, 2168-82.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T. and Yamashita, M.** (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J Cell Sci* **116**, 2781-2790.
- Lee, J., Kitajima, T. S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M. and Watanabe, Y.** (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol* **10**, 42-52.
- Lee, J., Okada, K., Ogushi, S., Miyano, T., Miyake, M. and Yamashita, M.** (2006). Loss of Rec8 from chromosome arm and centromere region is required for homologous chromosome separation and sister chromatid separation, respectively, in mammalian meiosis. *Cell Cycle* **5**, 1448-55.
- Lee, J. Y. and Orr-Weaver, T. L.** (2001). The molecular basis of sister-chromatid cohesion. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 753-77.
- Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, K. P., Shirahige, K. and Uhlmann, F.** (2006). Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell* **23**, 787-99.
- Li, H., Wang, Y. and Liu, X.** (2008). Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase IIalpha in cell cycle progression. *J Biol Chem* **283**, 6209-21.
- Li, W., Yang, X., Lin, Z., Timofejeva, L., Xiao, R., Makaroff, C. A. and Ma, H.** (2005). The AtRAD51C gene is required for normal meiotic chromosome synapsis and double-stranded break repair in Arabidopsis. *Plant Physiol* **138**, 965-76.
- Li, X. and Nicklas, R. B.** (1997). Tension-sensitive kinetochore phosphorylation and the chromosome distribution checkpoint in praying mantid spermatocytes. *J Cell Sci* **110** ( Pt 5), 537-45.
- Libby, B. J., De La Fuente, R., O'Brien, M. J., Wigglesworth, K., Cobb, J., Inselman, A., Eaker, S., Handel, M. A., Eppig, J. J. and Schimenti, J. C.** (2002). The mouse meiotic mutation mei1 disrupts chromosome synapsis with sexually dimorphic consequences for meiotic progression. *Dev Biol* **242**, 174-87.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K.** (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)* **3**, 817-26.
- Lima-de-Faria, A. and Jaworska, H.** (1968). Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature* **217**, 138-42.
- Lindroos, H. B., Strom, L., Itoh, T., Katou, Y., Shirahige, K. and Sjogren, C.** (2006). Chromosomal association of the Smc5/6 complex reveals that it functions in differently regulated pathways. *Mol Cell* **22**, 755-67.

- Lipkin, S. M., Moens, P. B., Wang, V., Lenzi, M., Shanmugarajah, D., Gilgeous, A., Thomas, J., Cheng, J., Touchman, J. W., Green, E. D. et al.** (2002). Meiotic arrest and aneuploidy in MLH3-deficient mice. *Nat Genet* **31**, 385-90.
- Lipp, J. J., Hirota, T., Poser, I. and Peters, J. M.** (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J Cell Sci* **120**, 1245-55.
- Liu, J. G., Yuan, L., Brundell, E., Bjorkroth, B., Daneholt, B. and Hoog, C.** (1996). Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp Cell Res* **226**, 11-9.
- Liu, L., Franco, S., Spyropoulos, B., Moens, P. B., Blasco, M. A. and Keefe, D. L.** (2004). Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6496-501.
- Liu, L. and Keefe, D. L.** (2008). Defective cohesin is associated with age-dependent misaligned chromosomes in oocytes. *Reprod Biomed Online* **16**, 103-12.
- Liu, Y., Tarsounas, M., O'Regan, P. and West, S. C.** (2007). Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem* **282**, 1973-9.
- Lombillo, V. A., Nislow, C., Yen, T. J., Gelfand, V. I. and McIntosh, J. R.** (1995). Antibodies to the kinesin motor domain and CENP-E inhibit microtubule depolymerization-dependent motion of chromosomes in vitro. *J Cell Biol* **128**, 107-15.
- Losada, A.** (2007). Cohesin regulation: fashionable ways to wear a ring. *Chromosoma* **116**, 321-9.
- Losada, A., Hirano, M. and Hirano, T.** (1998). Identification of Xenopus SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev* **12**, 1986-97.
- Losada, A., Hirano, M. and Hirano, T.** (2002). Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev* **16**, 3004-16.
- Losada, A. and Hirano, T.** (2001). Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. *Bioessays* **23**, 924-35.
- Losada, A. and Hirano, T.** (2005). Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins. *Genes Dev* **19**, 1269-87.
- Losada, A., Yokochi, T. and Hirano, T.** (2005). Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and Xenopus egg extracts. *J Cell Sci* **118**, 2133-41.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R. and Hirano, T.** (2000). Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the Xenopus and human cohesin complexes. *J Cell Biol* **150**, 405-16.
- Lowndes, N. F. and Toh, G. W.** (2005). DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* **15**, R99-R102.
- Luo, K., Yuan, J., Chen, J. and Lou, Z.** (2009). Topoisomerase IIalpha controls the decatenation checkpoint. *Nat Cell Biol* **11**, 204-10.
- Llano, E., Gómez, R., Gutiérrez-Caballero, C., Herrán, Y., Sánchez-Martín, M., Vázquez-Quinones, L., Hernández, T., de Álava, E., Cuadrado, A., Barbero, J. L. et al.** (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes Dev* **22**, 2400-13.
- Maeshima, K. and Laemmli, U. K.** (2003). A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell* **4**, 467-80.
- Mahadevaiah, S. K., Costa, Y. and Turner, J. M.** (2009). Using RNA FISH to study gene expression during mammalian meiosis. *Methods Mol Biol* **558**, 433-44.
- Mahadevaiah, S. K., Evans, E. P. and Burgoyne, P. S.** (2000). An analysis of meiotic impairment and of sex chromosome associations throughout meiosis in XYY mice. *Cytogenet Cell Genet* **89**, 29-37.
- Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M., Baudat, F., Rogakou, E. P., de Boer, P., Blanco-Rodriguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W. M. and Burgoyne, P. S.** (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**, 271-276.

**Mannini, L., Liu, J., Krantz, I. D. and Musio, A.** (2009). Spectrum and consequences of SMC1A mutations: The unexpected involvement of a core component of cohesin in human disease. *Hum Mutat*.

**Mao, Y., Desai, S. D. and Liu, L. F.** (2000). SUMO-1 conjugation to human DNA topoisomerase II isozymes. *J Biol Chem* **275**, 26066-73.

**Marchetti, F., Bishop, J. B., Lowe, X., Generoso, W. M., Hozier, J. and Wyrobek, A. J.** (2001). Etoposide induces heritable chromosomal aberrations and aneuploidy during male meiosis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3952-7.

**Marec, F.** (1996). Synaptonemal complexes in insects. *Int J Insect Morphol Embryol* **25**, 205-33.

**Marston, A. L. and Amon, A.** (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 983-97.

**Marston, A. L., Tham, W. H., Shah, H. and Amon, A.** (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* **303**, 1367-70.

**Mason, J. M.** (1976). Orientation disruptor (ord): a recombination-defective and disjunction-defective meiotic mutant in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **84**, 545-72.

**Matunis, M. J. and Pickart, C. M.** (2005). Beginning at the end with SUMO. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 565-6.

**Mc Intyre, J., Muller, E. G., Weitzer, S., Snyderman, B. E., Davis, T. N. and Uhlmann, F.** (2007). In vivo analysis of cohesin architecture using FRET in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **26**, 3783-93.

**McCarroll, R. M. and Fangman, W. L.** (1988). Time of replication of yeast centromeres and telomeres. *Cell* **54**, 505-13.

**McGuinness, B. E., Hirota, T., Kudo, N. R., Peters, J. M. and Nasmyth, K.** (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol* **3**, e86.

**Melby, T. E., Ciampaglio, C. N., Briscoe, G. and Erickson, H. P.** (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol* **142**, 1595-604.

**Meuwissen, R. L. J., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J. J., Riesewijk, A., van Iersel, M. and Heyting, C.** (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo J* **11**, 5091-5100.

**Michaelis, C., Ciosk, R. and Nasmyth, K.** (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45.

**Mikhailov, A., Cole, R. W. and Rieder, C. L.** (2002). DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr Biol* **12**, 1797-806.

**Mimitou, E. P. and Symington, L. S.** (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA Repair (Amst)* **8**, 983-95.

**Miyazaki, W. Y. and Orr-Weaver, T. L.** (1994). Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **28**, 167-187.

**Moens, P. B.** (1990). Unravelling meiotic chromosomes: topoisomerase II and other proteins. *J Cell Sci* **97** ( Pt 1), 1-3.

**Moens, P. B. and Earnshaw, W. C.** (1989). Anti-topoisomerase II recognizes meiotic chromosome cores. *Chromosoma* **98**, 317-22.

**Moens, P. B., Heyting, C., Dietrich, A. J., van Raamsdonk, W. and Chen, Q.** (1987). Synaptonemal complex antigen location and conservation. *J Cell Biol* **105**, 93-103.

**Moens, P. B. and Spyropoulos, B.** (1995). Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma* **104**, 175-82.

**Moldovan, G. L., Pfander, B. and Jentsch, S.** (2006). PCNA controls establishment of sister chromatid cohesion during S phase. *Mol Cell* **23**, 723-32.

**Moore, D. P. and Orr-Weaver, T. L.** (1998). Chromosome segregation during meiosis: building an unambivalent bivalent. *Curr Top Dev Biol* **37**, 263-99.

**Morrison, C., Henzing, A. J., Jensen, O. N., Osheroff, N., Dodson, H., Kandels-Lewis, S. E., Adams, R. R. and Earnshaw, W. C.** (2002). Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate. *Nucleic Acids Res* **30**, 5318-27.

**Moses, M. J.** (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 215-8.

**Moses, R. M. and Masui, Y.** (1990). Cytostatic factor (CSF) activity in cytosols extracted from *Xenopus laevis* eggs. *Exp Cell Res* **186**, 66-73.

**Murphy, S. B.** (1993). Secondary acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins. *J Clin Oncol* **11**, 199-201.

**Murray, A. W. and Szostak, J. W.** (1985). Chromosome segregation in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Biol* **1**, 289-315.

**Musio, A., Selicorni, A., Focarelli, M. L., Gervasini, C., Milani, D., Russo, S., Vezzoni, P. and Larizza, L.** (2006). X-linked Cornelia de Lange syndrome owing to SMC1L1 mutations. *Nat Genet* **38**, 528-30.

**Nasmyth, K.** (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **35**, 673-745.

**Nasmyth, K.** (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* **297**, 559-565.

**Nasmyth, K.** (2005). How do so few control so many? *Cell* **120**, 739-746.

**Nasmyth, K. and Haering, C. H.** (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu Rev Biochem* **74**, 595-648.

**Nasmyth, K. and Haering, C. H.** (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annu Rev Genet* **43**, 525-58.

**Nickerson, H. D., Joshi, A. and Wolgemuth, D. J.** (2007). Cyclin A1-deficient mice lack histone H3 serine 10 phosphorylation and exhibit altered aurora B dynamics in late prophase of male meiosis. *Dev Biol* **306**, 725-35.

**Nitiss, J. L.** (2009a). DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer* **9**, 327-37.

**Nitiss, J. L.** (2009b). Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 338-350.

**Noble, D., Kenna, M. A., Dix, M., Skibbens, R. V., Unal, E. and Guacci, V.** (2006). Intersection between the regulators of sister chromatid cohesion establishment and maintenance in budding yeast indicates a multi-step mechanism. *Cell Cycle* **5**, 2528-36.

**Novak, I., Wang, H., Revenkova, E., Jessberger, R., Scherthan, H. and Hoog, C.** (2008). Cohesin Smc1beta determines meiotic chromatin axis loop organization. *J Cell Biol* **180**, 83-90.

**Null, A. P., Hudson, J. and Gorbsky, G. J.** (2002). Both alpha and beta isoforms of mammalian DNA topoisomerase II associate with chromosomes in mitosis. *Cell Growth Differ* **13**, 325-33.

**Ocampo-Hafalla, M. T., Katou, Y., Shirahige, K. and Uhlmann, F.** (2007). Displacement and re-accumulation of centromeric cohesin during transient pre-anaphase centromere splitting. *Chromosoma* **116**, 531-44.

**Offenberg, H. H., Schalk, J. A., Meuwissen, R. L., van Aalderen, M., Kester, H. A., Dietrich, A. J. and Heyting, C.** (1998). SCP2: a major protein component of the axial elements of synaptonemal complexes of the rat. *Nucleic Acids Res* **26**, 2572-2579.

**Page, J., Suja, J. A., Santos, J. L. and Rufas, J. S.** (1998). Squash procedure for protein immunolocalization in meiotic cells. *Chromosome Res* **6**, 639-42.

**Page, S. L. and Hawley, R. S.** (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 525-58.

**Pang, A. L., Taylor, H. C., Johnson, W., Alexander, S., Chen, Y., Su, Y. A., Li, X., Ravindranath, N., Dym, M., Rennert, O. M. et al.** (2003). Identification of differentially expressed genes in mouse spermatogenesis. *J Androl* **24**, 899-911.

- Panizza, S., Tanaka, T., Hochwagen, A., Eisenhaber, F. and Nasmyth, K.** (2000). Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol* **10**, 1557-64.
- Parisi, S., McKay, M. J., Molnar, M., Thompson, M. A., van der Spek, P. J., van Drunen-Schoenmaker, E., Kanaar, R., Lehmann, E., Hoeijmakers, J. H. and Kohli, J.** (1999). Rec8p, a meiotic recombination and sister chromatid cohesion phosphoprotein of the Rad21p family conserved from fission yeast to humans. *Mol Cell Biol* **19**, 3515-28.
- Parra, M. T., Gómez, R., Viera, A., Page, J., Calvente, A., Wordeman, L., Rufas, J. S. and Suja, J. A.** (2006). A perikinetochoric ring defined by MCAK and Aurora-B as a novel centromere domain. *PLoS Genet* **2**, e84.
- Parra, M. T., Page, J., Yen, T. J., He, D., Valdeolmillos, A., Rufas, J. S. and Suja, J. A.** (2002). Expression and behaviour of CENP-E at kinetochores during mouse spermatogenesis. *Chromosoma* **111**, 53-61.
- Parra, M. T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J. L., Rufas, J. S. and Suja, J. A.** (2004). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* **117**, 1221-34.
- Parra, M. T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Carmena, M., Earnshaw, W. C., Rufas, J. S. and Suja, J. A.** (2003). Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *J Cell Sci* **116**, 961-74.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D. and Loidl, J.** (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev* **15**, 1349-60.
- Pauli, A., Althoff, F., Oliveira, R. A., Heidmann, S., Schuldiner, O., Lehner, C. F., Dickson, B. J. and Nasmyth, K.** (2008). Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Dev Cell* **14**, 239-51.
- Pelttari, J., Hoja, M. R., Yuan, L., Liu, J. G., Brundell, E., Moens, P., Santucci-Darmanin, S., Jessberger, R., Barbero, J. L., Heyting, C. et al.** (2001). A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol* **21**, 5667-77.
- Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C. and Demaille, J.** (2003). Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum Genet* **112**, 195-203.
- Perera, D., Tilston, V., Hopwood, J. A., Barchi, M., Boot-Handford, R. P. and Taylor, S. S.** (2007). Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint. *Dev Cell* **13**, 566-79.
- Persson, J. L., Zhang, Q., Wang, X. Y., Ravník, S. E., Muhlrád, S. and Wolgemuth, D. J.** (2005). Distinct roles for the mammalian A-type cyclins during oogenesis. *Reproduction* **130**, 411-22.
- Peters, A. H., Plug, A. W., van Vugt, M. J. and de Boer, P.** (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res* **5**, 66-68.
- Peters, J. M.** (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**, 931-43.
- Peters, J. M., Tedeschi, A. and Schmitz, J.** (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* **22**, 3089-114.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. and Nasmyth, K.** (2003). Un ménage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**, 423-40.
- Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Pérez Jurado, L. A., Valero, C., Del Mazo, J., Martínez, A. C. and Barbero, J. L.** (2000). STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *Faseb J* **14**, 581-92.
- Pichler, A., Gast, A., Seeler, J. S., Dejean, A. and Melchior, F.** (2002). The nucleoporin RanBP2 has SUMO1 E3 ligase activity. *Cell* **108**, 109-20.

**Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A. and Schimenti, J. C.** (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmcl1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* **1**, 697-705.

**Porter, A. C. and Farr, C. J.** (2004). Topoisomerase II: untangling its contribution at the centromere. *Chromosome Res* **12**, 569-83.

**Potts, P. R., Porteus, M. H. and Yu, H.** (2006). Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *Embo J* **25**, 3377-88.

**Pouwels, J., Kukkonen, A. M., Lan, W., Daum, J. R., Gorbsky, G. J., Stukenberg, T. and Kallio, M. J.** (2007). Shugoshin 1 plays a central role in kinetochore assembly and is required for kinetochore targeting of Plk1. *Cell Cycle* **6**, 1579-85.

**Prieto, I., Pezzi, N., Buesa, J. M., Kremer, L., Barthelemy, I., Carreiro, C., Roncal, F., Martínez, A., Gómez, L., Fernández, R. et al.** (2002). STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Rep* **3**, 543-50.

**Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martínez, A. C., Rufas, J. S. and Barbero, J. L.** (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* **3**, 761-6.

**Prieto, I., Tease, C., Pezzi, N., Buesa, J. M., Ortega, S., Kremer, L., Martínez, A., Martínez, A. C., Hulten, M. A. and Barbero, J. L.** (2004). Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* **12**, 197-213.

**Rabitsch, K. P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J. P., Eisenhaber, F. and Nasmyth, K.** (2004). Two fission yeast homologs of Drosophila Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr Biol* **14**, 287-301.

**Rankin, S.** (2005). Sororin, the cell cycle and sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* **4**, 1039-42.

**Rankin, S., Ayad, N. G. and Kirschner, M. W.** (2005). Sororin, a substrate of the anaphase-promoting complex, is required for sister chromatid cohesion in vertebrates. *Mol Cell* **18**, 185-200.

**Rattner, J. B., Hendzel, M. J., Furbee, C. S., Muller, M. T. and Bazett-Jones, D. P.** (1996). Topoisomerase II alpha is associated with the mammalian centromere in a cell cycle- and species-specific manner and is required for proper centromere/kinetochore structure. *J Cell Biol* **134**, 1097-107.

**Rattner, J. B., Kingwell, B. G. and Fritzler, M. J.** (1988). Detection of distinct structural domains within the primary constriction using autoantibodies. *Chromosoma* **96**, 360-7.

**Resnick, T. D., Satinover, D. L., MacIsaac, F., Stukenberg, P. T., Earnshaw, W. C., Orr-Weaver, T. L. and Carmena, M.** (2006). INCENP and Aurora B promote meiotic sister chromatid cohesion through localization of the Shugoshin MEI-S332 in Drosophila. *Dev Cell* **11**, 57-68.

**Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. and Jessberger, R.** (2001). Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* **21**, 6984-98.

**Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H. and Jessberger, R.** (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* **6**, 555-562.

**Revenkova, E. and Jessberger, R.** (2005). Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction* **130**, 783-90.

**Revenkova, E. and Jessberger, R.** (2006). Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* **115**, 235-40.

**Riedel, C. G., Katis, V. L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B. et al.** (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* **441**, 53-61.



- Rivera, T. and Losada, A.** (2006). Shugoshin and PP2A, shared duties at the centromere. *Bioessays* **28**, 775-9.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. and Bonner, W. M.** (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* **275**, 9390-5.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M.** (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-68.
- Rogers, R. S., Inselman, A., Handel, M. A. and Matunis, M. J.** (2004). SUMO modified proteins localize to the XY body of pachytene spermatocytes. *Chromosoma* **113**, 233-243.
- Rose, D., Thomas, W. and Holm, C.** (1990). Segregation of recombined chromosomes in meiosis I requires DNA topoisomerase II. *Cell* **60**, 1009-17.
- Rufas, J. S., Santos, J.L, Díez, M., Suja, J.A.** (1992). Meiotic chromosome structure: relationship between the synaptonemal complex and the chromatid cores. *Genome* **35**, 1054-1061.
- Russell, L. B., Hunsicker, P. R., Hack, A. M. and Ashley, T.** (2000). Effect of the topoisomerase-II inhibitor etoposide on meiotic recombination in male mice. *Mutat Res* **464**, 201-12.
- Russell, L. B., Hunsicker, P. R., Kerley, M., Pyle, A. and Saxton, A. M.** (2004). Etoposide exposure during male mouse pachytene has complex effects on crossing-over and causes nondisjunction. *Mutat Res* **565**, 61-77.
- Sakaguchi, A. and Kikuchi, A.** (2004). Functional compatibility between isoform alpha and beta of type II DNA topoisomerase. *J Cell Sci* **117**, 1047-54.
- Sakuno, T., Tada, K. and Watanabe, Y.** (2009). Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* **458**, 852-8.
- Salic, A., Waters, J. C. and Mitchison, T. J.** (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* **118**, 567-78.
- Salina, D., Enarson, P., Rattner, J. B. and Burke, B.** (2003). Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J Cell Biol* **162**, 991-1001.
- Schalk, J. A., Dietrich, A. J., Vink, A. C., Offenberg, H. H., van Aalderen, M. and Heyting, C.** (1998). Localization of SCP2 and SCP3 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Chromosoma* **107**, 540-8.
- Scherthan, H.** (2001). A bouquet makes ends meet. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 621-7.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M. and Cremer, T.** (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* **134**, 1109-25.
- Schmitz, J., Watrin, E., Lenart, P., Mechtler, K. and Peters, J. M.** (2007). Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr Biol* **17**, 630-6.
- Schrader, F.** (1939). The structure of the kinetochore at meiosis. *Chromosoma* **1**, 230-237.
- Schuldiner, O., Berdnik, D., Levy, J. M., Wu, J. S., Luginbuhl, D., Gontang, A. C. and Luo, L.** (2008). piggyBac-based mosaic screen identifies a postmitotic function for cohesin in regulating developmental axon pruning. *Dev Cell* **14**, 227-38.
- Schultz, N., Hamra, F. K. and Garbers, D. L.** (2003). A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12201-6.
- Shamu, C. E. and Murray, A. W.** (1992). Sister chromatid separation in frog egg extracts requires DNA topoisomerase II activity during anaphase. *J Cell Biol* **117**, 921-34.
- Sharan, S. K., Pyle, A., Coppola, V., Babus, J., Swaminathan, S., Benedict, J., Swing, D., Martin, B. K., Tessarollo, L., Evans, J. P. et al.** (2004). BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* **131**, 131-42.

- Shima, J. E., McLean, D. J., McCarrey, J. R. and Griswold, M. D.** (2004). The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *Biol Reprod* **71**, 319-30.
- Shintomi, K. and Hirano, T.** (2009). Releasing cohesin from chromosome arms in early mitosis: opposing actions of Wapl-Pds5 and Sgo1. *Genes Dev* **23**, 2224-36.
- Shonn, M. A., McCarroll, R. and Murray, A. W.** (2002). Spo13 protects meiotic cohesin at centromeres in meiosis I. *Genes Dev* **16**, 1659-71.
- Sjoblom, T., Parvinen, M. and Lahdetie, J.** (1994). Germ-cell mutagenicity of etoposide: induction of meiotic micronuclei in cultured rat seminiferous tubules. *Mutat Res* **323**, 41-5.
- Skibbens, R. V.** (2005). Unzipped and loaded: the role of DNA helicases and RFC clamp-loading complexes in sister chromatid cohesion. *J Cell Biol* **169**, 841-6.
- Skibbens, R. V., Corson, L. B., Koshland, D. and Hieter, P.** (1999). Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev* **13**, 307-19.
- Skibbens, R. V., Maradeo, M. and Eastman, L.** (2007). Fork it over: the cohesion establishment factor Ctf7p and DNA replication. *J Cell Sci* **120**, 2471-7.
- Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I. C., Peters, J. M. et al.** (2001). Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells. *Dev Cell* **1**, 759-70.
- Spence, J. M., Phua, H. H., Mills, W., Carpenter, A. J., Porter, A. C. and Farr, C. J.** (2007). Depletion of topoisomerase IIalpha leads to shortening of the metaphase interkinetochore distance and abnormal persistence of PICH-coated anaphase threads. *J Cell Sci* **120**, 3952-64.
- Stead, K., Aguilar, C., Hartman, T., Drexel, M., Meluh, P. and Guacci, V.** (2003). Pds5p regulates the maintenance of sister chromatid cohesion and is sumoylated to promote the dissolution of cohesion. *J Cell Biol* **163**, 729-41.
- Steffensen, S., Coelho, P. A., Cobbe, N., Vass, S., Costa, M., Hassan, B., Prokopenko, S. N., Bellen, H., Heck, M. M. and Sunkel, C. E.** (2001). A role for Drosophila SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis. *Curr Biol* **11**, 295-307.
- Stemmann, O., Zou, H., Gerber, S. A., Gygi, S. P. and Kirschner, M. W.** (2001). Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* **107**, 715-26.
- Stratmann, R. and Lehner, C. F.** (1996). Separation of sister chromatids in mitosis requires the Drosophila pimples product, a protein degraded after the metaphase/anaphase transition. *Cell* **84**, 25-35.
- Strom, L., Lindroos, H. B., Shirahige, K. and Sjogren, C.** (2004). Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair. *Mol Cell* **16**, 1003-15.
- Stursberg, S., Riwar, B. and Jessberger, R.** (1999). Cloning and characterization of mammalian SMC1 and SMC3 genes and proteins, components of the DNA recombination complexes RC-1. *Gene* **228**, 1-12.
- Suja, J. A., Antonio, C., Debec, A. and Rufas, J. S.** (1999). Phosphorylated proteins are involved in sister-chromatid arm cohesion during meiosis I. *J Cell Sci* **112** ( Pt 17), 2957-69.
- Suja, J. A. and Barbero, J. L.** (2009). Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn* **5**, 94-116.
- Suja, J. A. and Rufas, J. S.** (2008). Chromatid cores in meiotic chromosome structure and segregation.: Springer-Verlag.
- Sullivan, M., Higuchi, T., Katis, V. L. and Uhlmann, F.** (2004). Cdc14 phosphatase induces rDNA condensation and resolves cohesin-independent cohesion during budding yeast anaphase. *Cell* **117**, 471-82.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H. and Peters, J. M.** (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* **151**, 749-62.

**Sumara, I., Vorlauffer, E., Stukenberg, P. T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. A. and Peters, J. M.** (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* **9**, 515-25.

**Sumner, A. T.** (1996). The distribution of topoisomerase II on mammalian chromosomes. *Chromosome Res* **4**, 5-14.

**Sun, Y., Kucej, M., Fan, H. Y., Yu, H., Sun, Q. Y. and Zou, H.** (2009). Separase is recruited to mitotic chromosomes to dissolve sister chromatid cohesion in a DNA-dependent manner. *Cell* **137**, 123-32.

**Sundin, O. and Varshavsky, A.** (1980). Terminal stages of SV40 DNA replication proceed via multiply intertwined catenated dimers. *Cell* **21**, 103-14.

**Taagepera, S., Rao, P. N., Drake, F. H. and Gorbsky, G. J.** (1993). DNA topoisomerase II alpha is the major chromosome protein recognized by the mitotic phosphoprotein antibody MPM-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8407-11.

**Takahashi, T. S., Yiu, P., Chou, M. F., Gygi, S. and Walter, J. C.** (2004). Recruitment of Xenopus Scc2 and cohesin to chromatin requires the pre-replication complex. *Nat Cell Biol* **6**, 991-6.

**Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A., Ma, N., Kurihara, D., Ono-Maniwa, R., Nakagawa, M., Azuma, T., Uchiyama, S. and Fukui, K.** (2007). PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr Biol* **17**, 1356-61.

**Takata, M., Sasaki, M. S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L. H. and Takeda, S.** (2001). Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol* **21**, 2858-66.

**Tanaka, K., Hao, Z., Kai, M. and Okayama, H.** (2001). Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *Embo J* **20**, 5779-90.

**Tanaka, T., Fuchs, J., Loidl, J. and Nasmyth, K.** (2000). Cohesin ensures bipolar attachment of microtubules to sister centromeres and resists their precocious separation. *Nat Cell Biol* **2**, 492-9.

**Tang, T. T., Bickel, S. E., Young, L. M. and Orr-Weaver, T. L.** (1998). Maintenance of sister-chromatid cohesion at the centromere by the Drosophila MEI-S332 protein. *Genes Dev* **12**, 3843-56.

**Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N. A., Mumby, M. C. and Yu, H.** (2006). PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Dev Cell* **10**, 575-85.

**Tang, Z., Sun, Y., Harley, S. E., Zou, H. and Yu, H.** (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18012-7.

**Tateno, H. and Kamiguchi, Y.** (2001). Meiotic stage-dependent induction of chromosome aberrations in Chinese hamster primary oocytes exposed to topoisomerase II inhibitor etoposide. *Mutat Res* **476**, 139-48.

**Tateno, H. and Kamiguchi, Y.** (2002). Abnormal chromosome migration and chromosome aberrations in mouse oocytes during meiosis II in the presence of topoisomerase II inhibitor ICRF-193. *Mutat Res* **502**, 1-9.

**Tavormina, P. A., Come, M. G., Hudson, J. R., Mo, Y. Y., Beck, W. T. and Gorbsky, G. J.** (2002). Rapid exchange of mammalian topoisomerase II alpha at kinetochores and chromosome arms in mitosis. *J Cell Biol* **158**, 23-9.

**Taylor, J. H.** (1960). Asynchronous duplication of chromosomes in cultured cells of Chinese hamster. *J Biophys Biochem Cytol* **7**, 455-64.

**Taylor, S. S., Hussein, D., Wang, Y., Elderkin, S. and Morrow, C. J.** (2001). Kinetochores localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J Cell Sci* **114**, 4385-95.

- Tease, C. and Jones, G. H.** (1978). Analysis of Exchanges in Differentially Stained Meiotic Chromosomes of *Locusta-Migratoria* after Brdu-Substitution and Fpg Staining .1. Crossover Exchanges in Monochiasmate Bivalents. *Chromosoma* **69**, 163-178.
- Tepperberg, J. H., Moses, M. J. and Nath, J.** (1997). Colchicine effects on meiosis in the male mouse. I. Meiotic prophase: synaptic arrest, univalents, loss of damaged spermatocytes and a possible checkpoint at pachytene. *Chromosoma* **106**, 183-92.
- Tomkins, D., Hunter, A. and Roberts, M.** (1979). Cytogenetic findings in Roberts-SC phocomelia syndrome(s). *Am J Med Genet* **4**, 17-26.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S. E., Uhlmann, F. et al.** (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* **14**, 2757-70.
- Tonkin, E. T., Wang, T. J., Lisgo, S., Bamshad, M. J. and Strachan, T.** (2004). NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet* **36**, 636-41.
- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A. and Nasmyth, K.** (1999). Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev* **13**, 320-33.
- Tschumper, G. and Carbon, J.** (1983). Copy number control by a yeast centromere. *Gene* **23**, 221-32.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K. and Yanagida, M.** (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell* **50**, 917-25.
- Uhlmann, F.** (2003a). Chromosome cohesion and separation: from men and molecules. *Curr Biol* **13**, R104-14.
- Uhlmann, F.** (2003b). Separase regulation during mitosis. *Biochem Soc Symp*, 243-51.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F. and Nasmyth, K.** (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**, 37-42.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupert, M. A., Koonin, E. V. and Nasmyth, K.** (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375-86.
- Unal, E., Arbel-Eden, A., Sattler, U., Shroff, R., Lichten, M., Haber, J. E. and Koshland, D.** (2004). DNA damage response pathway uses histone modification to assemble a double-strand break-specific cohesin domain. *Mol Cell* **16**, 991-1002.
- Unal, E., Heidinger-Pauli, J. M. and Koshland, D.** (2007). DNA double-strand breaks trigger genome-wide sister-chromatid cohesion through Eco1 (Ctf7). *Science* **317**, 245-8.
- Vagnarelli, P., Morrison, C., Dodson, H., Sonoda, E., Takeda, S. and Earnshaw, W. C.** (2004). Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores. *EMBO Rep* **5**, 167-71.
- Vagnarelli, P. B. and Earnshaw, W. C.** (2001). INCENP loss from an inactive centromere correlates with the loss of sister chromatid cohesion. *Chromosoma* **110**, 393-401.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M. and Zhivotovsky, B.** (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* **15**, 1153-62.
- Valdeolmillos, A. M., Viera, A., Page, J., Prieto, I., Santos, J. L., Parra, M. T., Heck, M. M., Martínez, A. C., Barbero, J. L., Suja, J. A. et al.** (2007). Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers. *PLoS Genet* **3**, e28.
- Valdivia, M. M., Figueroa, J., Iglesias, C. and Ortiz, M.** (1998). A novel centromere monospecific serum to a human autoepitope on the histone H3-like protein CENP-A. *FEBS Lett* **422**, 5-9.
- van Heemst, D. and Heyting, C.** (2000). Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* **109**, 10-26.
- Vanoosthuyse, V., Prykhodzhiy, S. and Hardwick, K. G.** (2007). Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Mol Biol Cell* **18**, 1657-69.

- Vass, S., Cotterill, S., Valdeolmillos, A. M., Barbero, J. L., Lin, E., Warren, W. D. and Heck, M. M. (2003). Depletion of Drad21/Sccl in *Drosophila* cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. *Curr Biol* **13**, 208-18.
- Vaur, S., Cubizolles, F., Plane, G., Genier, S., Rabitsch, P. K., Gregan, J., Nasmyth, K., Vanoosthuyse, V., Hardwick, K. G. and Javerzat, J. P. (2005). Control of Shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Curr Biol* **15**, 2263-70.
- Vega, H., Waisfisz, Q., Gordillo, M., Sakai, N., Yanagihara, I., Yamada, M., van Gosliga, D., Kayserili, H., Xu, C., Ozono, K. et al. (2005). Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. *Nat Genet* **37**, 468-70.
- Verni, F., Gandhi, R., Goldberg, M. L. and Gatti, M. (2000). Genetic and molecular analysis of wings apart-like (*wapl*), a gene controlling heterochromatin organization in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **154**, 1693-710.
- Viera, A., Gómez, R., Parra, M. T., Schmiesing, J. A., Yokomori, K., Rufas, J. S. and Suja, J. A. (2007). Condensin I reveals new insights on mouse meiotic chromosome structure and dynamics. *PLoS ONE* **2**, e783.
- Viera, A., Parra, M. T., Page, J., Santos, J. L., Rufas, J. S. and Suja, J. A. (2003). Dynamic relocation of telomere complexes in mouse meiotic chromosomes. *Chromosome Res* **11**, 797-807.
- Vigodner, M., Ishikawa, T., Schlegel, P. N. and Morris, P. L. (2006). SUMO-1, human male germ cell development, and the androgen receptor in the testis of men with normal and abnormal spermatogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E1022-33.
- Vigodner, M. and Morris, P. L. (2005). Testicular expression of small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) supports multiple roles in spermatogenesis: silencing of sex chromosomes in spermatocytes, spermatid microtubule nucleation, and nuclear reshaping. *Dev Biol* **282**, 480-92.
- von Wettstein, D., Rasmussen, S. W. and Holm, P. B. (1984). The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu Rev Genet* **18**, 331-413.
- Waizenegger, I., Giménez-Abián, J. F., Wernic, D. and Peters, J. M. (2002). Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol* **12**, 1368-78.
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A. and Peters, J. M. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**, 399-410.
- Wang, F., Yoder, J., Antoshechkin, I. and Han, M. (2003). *Caenorhabditis elegans* EVL-14/PDS-5 and SCC-3 are essential for sister chromatid cohesion in meiosis and mitosis. *Mol Cell Biol* **23**, 7698-707.
- Wang, P. J., Page, D. C. and McCarrey, J. R. (2005). Differential expression of sex-linked and autosomal germ-cell-specific genes during spermatogenesis in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2911-2918.
- Wang, X., Yang, Y., Duan, Q., Jiang, N., Huang, Y., Darzynkiewicz, Z. and Dai, W. (2008). sSgo1, a major splice variant of Sgo1, functions in centriole cohesion where it is regulated by Plk1. *Dev Cell* **14**, 331-41.
- Warburton, P. E. and Earnshaw, W. C. (1997). Untangling the role of DNA topoisomerase II in mitotic chromosome structure and function. *Bioessays* **19**, 97-9.
- Warren, W. D., Steffensen, S., Lin, E., Coelho, P., Loupart, M., Cobbe, N., Lee, J. Y., McKay, M. J., Orr-Weaver, T., Heck, M. M. et al. (2000). The *Drosophila* RAD21 cohesin persists at the centromere region in mitosis. *Curr Biol* **10**, 1463-6.
- Watanabe, Y. (2004). Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *J Cell Sci* **117**, 4017-23.
- Watanabe, Y. (2005). Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 590-5.
- Watanabe, Y. and Kitajima, T. S. (2005). Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 515-21, discussion 521.

- Watanabe, Y. and Nurse, P.** (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**, 461-4.
- Watrin, E. and Peters, J. M.** (2006). Cohesin and DNA damage repair. *Exp Cell Res* **312**, 2687-93.
- Weitzer, S., Lehane, C. and Uhlmann, F.** (2003). A model for ATP hydrolysis-dependent binding of cohesin to DNA. *Curr Biol* **13**, 1930-40.
- Wells, N. J. and Hickson, I. D.** (1995). Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur J Biochem* **231**, 491-7.
- Wendt, K. S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiro, T. et al.** (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCTC-binding factor. *Nature* **451**, 796-801.
- Westergaard, M. and von Wettstein, D.** (1972). The synaptonemal complex. *Annu Rev Genet* **6**, 71-110.
- Wirth, K. G., Wutz, G., Kudo, N. R., Desdouets, C., Zetterberg, A., Taghybeeglu, S., Seznec, J., Ducos, G. M., Ricci, R., Firnberg, N. et al.** (2006). Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol* **172**, 847-60.
- Woessner, R. D., Mattern, M. R., Mirabelli, C. K., Johnson, R. K. and Drake, F. H.** (1991). Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth Differ* **2**, 209-14.
- Wong, K. A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G. and Wu, H.** (2004). Protein inhibitor of activated STAT Y (PIASy) and a splice variant lacking exon 6 enhance sumoylation but are not essential for embryogenesis and adult life. *Mol Cell Biol* **24**, 5577-86.
- Wordeman, L. and Mitchison, T. J.** (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol* **128**, 95-104.
- Xu, H., Beasley, M., Verschoor, S., Inselman, A., Handel, M. A. and McKay, M. J.** (2004). A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse. *EMBO Rep* **5**, 378-84.
- Xu, H., Beasley, M. D., Warren, W. D., van der Horst, G. T. and McKay, M. J.** (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev Cell* **8**, 949-61.
- Xu, Z. and Au, S. W.** (2005). Mapping residues of SUMO precursors essential in differential maturation by SUMO-specific protease, SENP1. *Biochem J* **386**, 325-30.
- Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M. and Watanabe, Y.** (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* **455**, 251-5.
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F. and Cleveland, D. W.** (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat Cell Biol* **2**, 484-91.
- Yokobayashi, S., Yamamoto, M. and Watanabe, Y.** (2003). Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Mol Cell Biol* **23**, 3965-73.
- Yu, H. G., Muszynski, M. G. and Kelly Dawe, R.** (1999). The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns. *J Cell Biol* **145**, 425-35.
- Yuan, L., Liu, J. G., Hoja, M. R., Wilbertz, J., Nordqvist, K. and Hoog, C.** (2002). Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science* **296**, 1115-8.
- Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B. and Hoog, C.** (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* **5**, 73-83.
- Yuan, L., Pelttari, J., Brundell, E., Bjorkroth, B., Zhao, J., Liu, J. G., Brismar, H., Daneholt, B. and Hoog, C.** (1998). The synaptonemal complex protein SCP3 can form multistranded, cross-striated fibers in vivo. *J Cell Biol* **142**, 331-9.

**Zhang, B., Jain, S., Song, H., Fu, M., Heuckeroth, R. O., Erlich, J. M., Jay, P. Y. and Milbrandt, J.** (2007). Mice lacking sister chromatid cohesion protein PDS5B exhibit developmental abnormalities reminiscent of Cornelia de Lange syndrome. *Development* **134**, 3191-201.

**Zhang, J., Hakansson, H., Kuroda, M. and Yuan, L.** (2008a). Wapl localization on the synaptonemal complex, a meiosis-specific proteinaceous structure that binds homologous chromosomes, in the female mouse. *Reprod Domest Anim* **43**, 124-6.

**Zhang, N., Kuznetsov, S. G., Sharan, S. K., Li, K., Rao, P. H. and Pati, D.** (2008b). A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol* **183**, 1019-31.

**Zhang, Z., Ren, Q., Yang, H., Conrad, M. N., Guacci, V., Kateneva, A. and Dresser, M. E.** (2005). Budding yeast PDS5 plays an important role in meiosis and is required for sister chromatid cohesion. *Mol Microbiol* **56**, 670-80.

**Zickler, D.** (1999). [The synaptonemal complex: a structure necessary for pairing, recombination or organization of the meiotic chromosome?]. *J Soc Biol* **193**, 17-22.

**Zickler, D. and Kleckner, N.** (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* **33**, 603-754.

**Zou, H., Stemman, O., Anderson, J. S., Mann, M. and Kirschner, M. W.** (2002). Anaphase specific auto-cleavage of separase. *FEBS Lett* **528**, 246-50.